

Aus dem Institut für Virologie der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. R. Rott

Beeinflussung des Zellstoffwechsels nach der Infektion
mit dem Virus der Klassischen Geflügelpest

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

ESSAM EL-DIN MOHAMED AYAD

Tierarzt aus Kafr El-Sheikh/V. A. R.

Gießen 1966

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

Aus dem Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. R. Rott

Beeinflussung des Zellstoffwechsels nach der Infektion

mit dem Virus der Klassischen Geflügelpest

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

Essam El- Din Mohamed Ayad

Tierarzt aus Kafr El-Sheikh/V.A.R.

G i e ß e n 1 9 6 6

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen

Dekan: Prof. Dr. H. Bartels

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 1966

I. Einleitung und Vorbemerkungen 7

II. Das Bild der klassischen Gedichtsbearbeitung 11

III. Der Aufbau des Gedichtes 15

IV. Die Darstellung des Gedichtes 19

V. Die Darstellung des Gedichtes 23

VI. Die Darstellung des Gedichtes 27

VII. Die Darstellung des Gedichtes 31

VIII. Die Darstellung des Gedichtes 35

IX. Die Darstellung des Gedichtes 39

X. Die Darstellung des Gedichtes 43

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

XI. Die Darstellung des Gedichtes 47

XII. Die Darstellung des Gedichtes 51

XIII. Die Darstellung des Gedichtes 55

XIV. Die Darstellung des Gedichtes 59

XV. Die Darstellung des Gedichtes 63

XVI. Die Darstellung des Gedichtes 67

XVII. Die Darstellung des Gedichtes 71

XVIII. Die Darstellung des Gedichtes 75

XIX. Die Darstellung des Gedichtes 79

XX. Die Darstellung des Gedichtes 83

XXI. Die Darstellung des Gedichtes 87

XXII. Die Darstellung des Gedichtes 91

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	1
II. Das Virus der Klassischen Geflügelpest	4
III. Material und Methoden	10
IV. Untersuchungsergebnisse	21
A. Beeinflussung des Stoffwechsels der Wirtszelle mit komplettem, infektiösem KP-Virus	21
1. RNS-Stoffwechsel	21
a) Einbauversuche	21
b) Saccharose-Gradienten-Versuche	24
2. DNS-Stoffwechsel	30
3. Protein-Stoffwechsel	30
B. Beeinflussung des Stoffwechsels der Wirtszellen nach der Infektion mit inkompletem, nichtinfektiösem KP-Virus	32
1. Studien mit chemisch inaktivierten Viren	35
a) RNS-Stoffwechsel	36
b) Proteinstoffwechsel	40
2. Biologisch inaktiviertes Virus	42
a) RNS-Stoffwechsel	42
b) Proteinstoffwechsel	45
V. Besprechung der Ergebnisse	45
VI. Zusammenfassung	52
VII. Literaturverzeichnis	53
Lebenslauf	

I. Einleitung und Problemstellung

Wird eine Zelle durch ein entsprechendes Virus infiziert, so beginnt diese in den meisten Fällen nach einiger Zeit die verschiedenen Viruskomponenten zu synthetisieren, die sich später zu dem infektiösen Viruspartikel (Viria; Singular: Virion) zusammenschließen. Die hierfür benötigten Enzymsysteme werden zum größten Teil von der Wirtszelle zur Verfügung gestellt.

Die Wirtszelle wird durch die bei der Virusvermehrung ablaufenden Prozesse in jedem Falle alteriert. Es wird allgemein angenommen, daß die Alteration auf einer Veränderung ihres Gesamtstoffwechsels beruht, der nach Infektion mit cytocyten Viren mehr oder weniger stark gehemmt wird. So führt die Infektion mit Poliomyelitis-Virus oder mit animalen Viren, die in ihren biologischen und physiko-chemischen Eigenschaften diesen nahestehen (Columbia SK-Viren), schon bevor virusspezifische Komponenten nachgewiesen werden können, zu einer Hemmung der Synthese des genetischen Materials der Wirtszelle, also der Zell-Desoxyribonukleinsäure (DNS). Sie geht in etwa parallel mit einer nahezu vollkommenen Hemmung der Ribonukleinsäure(RNS)-Synthese im Zellkern. An Stelle der normalerweise im Kern erfolgenden RNS-Synthese tritt im virusinfizierten System eine neue, starke RNS-Synthese im Cytoplasma. Bei dieser im Cytoplasma synthetisierten RNS handelt es sich offensichtlich um Virus-RNS. Die Hemmung der zellulären RNS-Synthese wird von einem

erheblichen Rückgang der Protein-Synthese begleitet (Scholtissek et al., 1962; Franklin und Baltimore, 1962). Für diese drastischen Änderungen im Gesamtstoffwechsel, der durch Columbia SK-Viren infizierten Zellen, werden Substanzen verantwortlich gemacht, die unmittelbar vom genetischen Material der in die Zellen eingedrungenen Viruspartikel induziert werden (Hausen, persönliche Mitteilung). Zusätzlich scheinen, zumindest bei den mit Polioviren infizierten Zellen, Substanzen gebildet zu werden, die unabhängig von und zusätzlich zu dem beschriebenen Hemm-Mechanismus den zellzerstörenden (cytopathogenen) Effekt auslösen (Bablanian et al., 1965).

Im Gegensatz zu den genannten kleinen RNS-haltigen Viren, die den zellulären RNS- und Proteinstoffwechsel abschalten, bevor sie mit ihrer eigenen Synthese beginnen, ist die Bildung der Myxoviren grundsätzlich eine zusätzliche Leistung der Zelle. Hier wird der Gesamtstoffwechsel der Wirtszelle erst gestört, wenn die Hauptmenge der Viruskomponente synthetisiert ist. Es wird vermutet, daß der beobachtete Abfall der Syntheserate für zelleigene RNS und zelleigenes Protein zu späteren Zeiten nach der Infektion eine Folge der Überforderung der virusinfizierten Zelle ist, die letztlich zu ihrer Nekrose führt (Scholtissek und Rott, 1961; 1965).

Die Myxoviren scheinen demnach eine Stellung zwischen den rein destruktiven und den onkogenen Viren einzunehmen. Ob-

wohl bis jetzt noch keine umfangreichen Untersuchungen über den Stoffwechsel der mit Tumor-erzeugenden Viren infizierten Zellen vorliegen, ist doch anzunehmen, daß sie denselben in noch geringerem Grade hemmen als die Myxoviren. Von den Tumurviren wird a priori erwartet, daß sie die Zellen zu unbeschränktem Wachstum anregen.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, weitere Aufschlüsse über die durch Myxoviren hervorgerufenen Stoffwechselveränderungen der Zellen zu bekommen. Darüber hinaus sollte die Frage experimentell geklärt werden, welche Faktoren für den cytopathogenen Effekt dieser Viren verantwortlich gemacht werden können. Als Modell wurde hierzu das Virus der klassischen Geflügelpest (KP-Virus) benutzt, für das ein zur Lösung dieser Aufgabe geeignet erscheinendes System zur Verfügung stand:

Wie Scholtissek und Rott (1963, 1964) zeigten, läßt sich isoliertes KP-Virus mit Chemikalien, die entweder seine genetische Information verändern oder Brüche in dessen RNS hervorrufen, partiell so inaktivieren, daß parallel mit der Einwirkungszeit des Präparates schrittweise die Potenz dieses Virus abnimmt, infektiöse Viruspartikel, Virus-Hämagglutinin, Neuraminidase und Ribonukleoproteid (RNP-Antigen) zu synthetisieren. Durch Bestimmung der Treffergrößen konnten von den genannten Autoren Angaben über die absolute Größe der einzelnen Gene gemacht werden, die für die Synthese der entsprechenden Virusproteine notwendig sind. Mit Hil-

fe dieser Methode können die einzelnen Phasen der Virusvermehrung mehr oder weniger getrennt und deren Abhängigkeit voneinander studiert werden.

Ein ähnliches System liegt in dem sogenannten von Magnus-Phänomen (v. Magnus, 1954) vor, bei dem eine partielle Inaktivierung der Virus-RNS auf biologischem Wege möglich ist (Rott und Scholtissek, 1963; Scholtissek et al., 1966).

II. Das Virus der Klassischen Geflügelpest

Die zuerst von Perroncito (1878) in Italien beschriebene Klassische Geflügelpest ist eine gewöhnlich akut verlaufende, sehr ansteckende, normalerweise tödliche Erkrankung der hühnerartigen Vögel, ausnahmsweise auch des Wassergeflügels. Die Krankheit war früher weltweit verbreitet und von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Heute tritt die Klassische Geflügelpest nur noch in Nordafrika und sporadisch in einigen europäischen Ländern und vielleicht auch in Burma und Chile auf.

Nach einer Inkubationszeit von 3 - 7 Tagen beginnt die Krankheit meist sehr plötzlich. Dabei können die Tiere oft sterben, ohne deutliche klinische Erscheinungen gezeigt zu haben. Die ersten Symptome sind sonst gesträubtes Gefieder, Inappetenz, Schwäche, und nervöse Symptome, die von Oedemen und Cyanosen an Kopf und Hals, Conjunktivitis und Rhi-

nitis gefolgt sein können. Meist treten wäßriger grünlicher Durchfall, nicht selten Atemnot auf. Unter diesen Erscheinungen tritt der Tod meist innerhalb von zwei Tagen ein. Öfters sind auch zentralnervöse Erscheinungen zu beobachten. Die Mortalität beträgt 40 - 100 %.

Wie in ihren klinischen Symptomen läßt sich die Klassische Geflügelpest auch in ihren pathologisch-anatomischen Erscheinungen nur sehr undeutlich von der atypischen Geflügelpest (Newcastle disease) abgrenzen. Wie bei dieser so steht auch bei der Klassischen Geflügelpest das Bild der hämorrhagischen Septikämie mit punktförmigen bis flächenhaften Blutungen an verschiedenen Organen im Vordergrund (vergl. Fritzsche und Gerriets, 1962).

Centanni und Savonuzzi wiesen bereits 1900 ein filtrierbares Virus als Erreger der Klassischen Geflügelpest nach. Das Virion der Klassischen Geflügelpest ist im allgemeinen kugelförmig mit einem mittleren Durchmesser von etwa 80 mμ. Daneben kommen gelegentlich auch hantelförmige und filamentöse Virusteilchen vor. Biologische und physiko-chemische Untersuchungen ergaben, daß das KP-Virus zu den Myxoviren gehört. Es ist wie diese in der Lage, Erythrozyten zu agglutinieren und besitzt ein Enzym, das die Ketosidische Bindung zwischen Acyl-Derivaten der Neuraminsäure und anderer Zucker hydrolisiert und als Neuraminidase bezeichnet wird. Die Myxoviren enthalten in ihrem Inneren eine Komponente, die aus Ribonukleinsäure und Protein besteht

und als Ribonukleoproteid(RNP)-Antigen bezeichnet wird. Das RNP-Antigen ist von einer Außenhülle umgeben, die außer Proteinen noch Lipide und Kohlenhydrate besitzt. Auf ihr sind das Hämagglutinin und die Neuraminidase sowie die immunogene und eine toxische Komponente des Virus lokalisiert. Eine erschöpfende Beschreibung der Struktur der Myxoviren mit einer umfassenden Literaturzusammenstellung wurde von Rott (1965) publiziert.

Auf Grund feinerer morphologischer und biologischer Unterschiede lassen sich die Myxoviren in zwei Untergruppen aufteilen, nämlich in die Influenza- und die Parainfluenzaviren. Das KP-Virus gehört zur Influenza-Untergruppe (Schäfer, 1955). Eine Zusammenfassung über die Systematik der Myxoviren bringt Tabelle 1.

Neben den infektiösen Viruspartikeln werden bei den Viren der Influenzagruppe noch Teilchen gefunden, die keine oder nur eine relativ geringe Infektiosität besitzen, und im Schwerfeld der Ultrazentrifuge langsamer als die infektiösen Partikel absinken. Sie werden wie die Viria von den Wirtszellen in das umgebende Medium ausgeschieden und treten vor allem dann auf, wenn die Influenzaviren über mehrere Passagen in hoher Multiplizität (Viruspartikel/Zelle) weiter verimpft werden. Dieses Verfahren wurde zuerst von v. Magnus (1954) beschrieben und später als von Magnus-Phänomen bezeichnet. Die dadurch gewonnenen inkompletten Viren unterscheiden sich in ihrer Oberflä-

Myxoviren

Influenza-Gruppe

Influenza A-Viren

A-, A₁-, A₂-Stämme des Menschen
Schweineinfluenza
Pferdeinfluenza (Praha, Miami)
Enteninfluenza
Klassische Geflügelpest
Virus N, u.a. Stämme bei Vögeln

Influenza B-Viren

Influenza C-Viren

Parainfluenza-Gruppe

Newcastle disease Virus

Mumpsvirus

Parainfluenza I Virus (HA2, Sendai)

Parainfluenza II Virus (CA, SV5, Hühner-
virus)

Parainfluenza III Virus (HA1, Kälber-
virus)

Tabelle 1

Systematik der Myxoviren

chenstruktur nur wenig von den Viria. Sie enthalten jedoch nur maximal 50 % der Virus-RNS und des RNP-Antigen-Proteins (vergl. Rott und Scholtissek, 1963).

Bei ihrer Vermehrung weisen die zur Influenza-Untergruppe gehörenden Viren einige Besonderheiten auf, die sie grundsätzlich von den anderen näher untersuchten RNS-haltigen Viren unterscheiden. Aus den bisher beschriebenen Versuchen, die hauptsächlich mit dem KP-Virus durchgeführt wurden, ergibt sich folgendes Bild der Vermehrung der Influenzaviren (vergl. Rott und Scholtissek, 1966). Nach der Infektion der Zellen verliert das Virus zunächst seine Infektiosität. Versuche mit P^{32} -markiertem Virus haben ergeben, daß kurze Zeit nach der Infektion das RNP-Antigen freigesetzt wird. Die Virus-RNS induziert dann zunächst die Bildung eines Frühproteins, ohne das eine Reduplikation der Virus-RNS nicht möglich ist. Es spricht einiges dafür, daß es sich bei dem Frühprotein um eine RNS-abhängige RNS-Polymerase handelt. Die Virus-RNS-Synthese beginnt etwa 1 1/2 Stunden nach der Infektion. Sie findet, wie autoradiographische Untersuchungen an Earle's L-Zellen ergaben, im Zellkern statt. Die neugebildete Virus-RNS wird sofort nach ihrer Synthese an das RNP-Antigen-Protein gebunden. Dieses RNP-Antigen, das mit Hilfe biologischer Methoden 2 Stunden nach der Infektion nachweisbar ist, wird - wie aus Untersuchungen mit fluoreszierenden Antikörpern hervorgeht - ebenfalls im Zellkern gebildet. Eine Stunde später erscheint neues, biologisch aktives Hämag-

glutinin im Cytoplasma. Eine für die Synthese von Virusprotein im Cytoplasma notwendige virusspezifische Boten-RNS konnte mit den zur Zeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht erfaßt werden. Es wurde daher angenommen, daß zumindest Teile des Hämagglutinins ebenfalls im Zellkern synthetisiert werden und erst im Cytoplasma ihre virusspezifische antigene Struktur erhalten. Für diese Anschauung sprechen auch Einbauversuche mit radioaktiven Isotopen, nach denen das Hämagglutinin-Protein zur selben Zeit wie das RNP-Antigen-Protein synthetisiert wird. Die Bildung der Virus-Neuraminidase wird ebenfalls von der Virus-RNS induziert. Sie beginnt mit der des Hämagglutinins. Im weiteren Verlauf der Infektion verlagern sich die neusynthetisierten Viruskomponenten in Richtung auf die Zellperipherie, wo sie schließlich unter Verwendung von Material der Zellwand zu den neuen Viria zusammengebaut werden. Die Freisetzung der reifen Viria erfolgt kontinuierlich unter Mitwirkung der Virus-Neuraminidase (Seto und Rott, 1966). Der Vermehrungszyklus des KP-Virus ist nach etwa 6 Stunden abgeschlossen. Eine virusinfizierte Zelle produziert im Durchschnitt 200 - 500 infektiöse Viruspartikel.

Untersuchungen zur Analyse des v. Magnus-Phänomens haben ergeben, daß während der Bildung der inkompletten KP-Viren die virusspezifischen Komponenten in normaler Menge von der Wirtszelle synthetisiert werden. Die erhaltenen Befunde sprechen dafür, daß den inkompletten Formen ein identi-

sches Stück ihres Genomes fehlt, sie enthalten jedoch die Teile der RNS, welche die Synthese des Frühproteins des RNP-Antigens und des Hämagglutinins "koden". Rott und Scholtissek (1963) nehmen an, daß bei der Verimpfung einer großen Viruszahl pro Zelle, so viele Synthese-Zentren zur Produktion der Viruskomponenten gebildet werden, daß die in der Zelle zur Verfügung stehenden Baustoffe nicht mehr ausreichen, in der zur Verfügung stehenden Zeit, das intakte genetische Material der Viren zu synthetisieren. Die Folge davon wäre eine Art autokatalytische Verkürzung der Virus-RNS mit steigenden Passagen.

III. Material und Methoden

1. Virus

Für die Untersuchungen wurde ausschließlich der KP-Virus-Stamm "Rostock" verwendet, der in Hühnerei-Passagen fortgeführt wird.

Als Standardvirus diente frisch gewonnene Eiflüssigkeit von embryonierten Eiern, die am 11. Bebrütungstag mit $10^1 - 10^2$ plaquebildenden Einheiten (PBE) infiziert worden waren.

Unverdünnte Passagen zur Gewinnung der inkompletten KP-Viren wurden ebenfalls in embryonierten Hühnereiern durch-

geführt (Rott und Schäfer, 1960). Hierzu wurden 11 Tage lang bei 37° C bebrütete, befruchtete Eier durch Injektion von 0,5 ml unverdünntem Standardvirus ($10^{8,0} - 10^{8,5}$ PBE) in die Allantoishöhle infiziert und 18 Stunden bei 37° C gehalten. Danach wurde die Eiflüssigkeit in der üblichen Weise entnommen und unverdünnt für die nächste Passage verwendet.

2. Inaktivierung des KP-Virus mit dem Bayer-Präparat A 139

Für die Inaktivierung wurde das Virus aus Allantoisflüssigkeiten in der Spinco-Ultrazentrifuge bei einem π (Giebler, 1958) von 7,5 abgeschleudert und in 0,1 M Trismaleinatpuffer pH 6,7 aufgenommen. Das Bayer-Präparat A 139, das uns freundlicherweise von den Bayerwerken, Leverkusen, zur Verfügung gestellt wurde, wurde in demselben Puffer in 2 %iger Lösung suspendiert, zu gleichen Teilen mit den Viruslösungen gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden aliquote Teile entnommen, 1 : 1 mit kaltem 0,1 M Trismaleinatpuffer pH 8,0 gemischt und gegen NaCl-Phosphatpufferlösung, pH 7,2 bei 4° C dialysiert. Die Bayer-Präparat-freien Viruslösungen wurden dann für die weiteren Versuche verwendet (vergl. Scholtissek et al., 1962).

3. Gewebekultur

Für die Vermehrung des KP-Virus eignen sich besonders gut primäre Gewebekulturen aus embryonalen Hühnerzellen, die im Prinzip nach der von Dulbecco (1952) beschriebenen Methode hergestellt wurden. Dazu wurden 11 Tage alte dekapitierte Embryonen mit der Schere zerkleinert und in NaCl-Phosphatpuffer, pH 7,2, der 0,25 % Trypsin enthält, für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren inkubiert. Dadurch werden aus dem Gewebeverband Einzelzellen in Freiheit gesetzt, die zunächst durch ein Nylon-Netz filtriert und anschließend in der Zentrifuge bei 500 Umdrehungen pro Minute abgeschleudert und gewaschen wurden. Nach Aufnahme im Wachstumsmedium (siehe unten) und Einstellen der gewünschten Zellzahl (5×10^6 Zellen/ml) wurden die Zellen in Petrischalen ausgegossen, wo sie nach etwa 24 Stunden bei 37° C einen dichten Zellrasen bilden. Der pH-Wert der Kultur muß im neutralen Bereich liegen. Das wurde durch Einleiten eines konstanten CO_2 -Stromes in den Brutschrank erreicht. Dadurch wurde im Kulturmedium eine Kohlensäure-Konzentration erzeugt, die mit dem als Puffer verwendeten Bicarbonat einen bestimmten pH-Wert ergibt.

4. Infektion der Gewebekulturen

Aus 24 Stunden alten Gewebekulturen wurden die Wachstumsmedien abgesaugt und die Zellen mit NaCl-Phosphatpufferlösung, pH 7,2 einmal gewaschen. Danach wurde das Virus-

material auf die Zellen gegeben und die infizierten Zellen 30 Minuten lang bei 37° C bebrütet. Anschließend wurde das nicht adsorbierte Virus durch dreimaliges Waschen entfernt und die Zellen mit neuem Medium bedeckt.

5. Plaque-Test

Zur Bestimmung der Infektiosität wurde der von Dulbecco (1952) entwickelte Plaque-Test verwendet. Hierzu wurden die Zellkulturen 24 Stunden nach ihrem Anlegen mit 0,2 ml einer Testlösung, die nach Potenzen von 10 verdünnt wurde, infiziert und nach Adsorption der Viruspartikel an die Zellen (Adsorptionszeit: 30 Minuten bei 37° C) mit Agarhaltigem Medium überschichtet. Nach drei Tagen, das sind etwa 10 Vermehrungszyklen, wurden die überlebenden Zellen mit Neutralrot angefärbt. Von einer bestimmten Verdünnung ab, kann man die Plaques, das sind die farblosen Herde abgestorbener Zellen, auf rotem Hintergrund auszählen. Man berechnet dann unter Berücksichtigung des Verdünnungsgrades die plaquebildenden Einheiten pro ml (PBE).

6. Hämagglutinationsreaktion

Für die Hämagglutinationsreaktion wurde die vom Committee on Standard Serological Procedures in Influenza Studies (1950) empfohlene Methode benützt. Zu 0,4 ml einer nach Potenzen von 2 verdünnten Viruslösung werden 0,4 ml einer 1 %igen Hühnererythrozyten-Suspension hinzugegeben und die

Mischung 45 Minuten bei Raumtemperatur gehalten. Nach dieser Zeit wird das Ergebnis abgelesen.

7. Markierung von RNS, DNS und Proteinen mit radioaktiven Vorläufern

a) Markierung der RNS und des säurelöslichen Pools.

0,25 μC C^{14} -Uridin wurden pro Kulturplatte dem Minimalmedium zugegeben. Nach der entsprechenden Einbauzeit wurden die Kulturen mit kaltem NaCl-Phosphatpuffer, pH 7,2 zweimal gewaschen.

b) Messung des säurelöslichen Anteils.

Der nichteingebaute Anteil der radioaktiven Verbindung konnte direkt auf den Gewebekulturplatten mit 10 ml kalter 6 %iger (w/v) Trichloressigsäure (TCE) entfernt werden. Die Radioaktivität dieses Anteils wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt:

Einmal wurden 3 ml von jedem Stundenwert nach Neutralisation mit 4 N KOH auf Aluminiumplättchen aufgedampft und in einem Methandurchflußzähler (Friesseke & Hoepfner, Erlangen-Bruck) ausgezählt.

Zum anderen wurde 1 ml des säurelöslichen Extraktes direkt in ein Glasprobenfläschchen (Packard Instrument GmbH) pipettiert und 12 ml Bray-Scintillator dazugegeben und im

Tri-Carb-Scintillationszähler gemessen. Mit Hilfe einer Eichkurve wurde die Korrektur für die Selbstabsorption vorgenommen.

c) Messung der RNS

Die Gewebekulturplatten wurden nach der Entfernung vom säurelöslichen Anteil dreimal mit kalter 6 %iger TCE und anschließend zweimal mit Äthanol (96%) und einmal mit Diäthyläther gewaschen und getrocknet. Für die Messung der Radioaktivität in der RNS benutzten wir zwei verschiedene Methoden:

Einmal wurde die Zellschicht in 98 - 100 %iger Ameisensäure aufgelöst und auf Aluminiumplättchen aufgedampft. Die Petrischalen wurden noch zweimal mit je 1,5 ml Ameisensäure nachgewaschen. Anschließend wurden die mit radioaktivem Material belegten Plättchen im Geigerzähler ausgemessen. Das Trockengewicht der Zellmasse wurde bestimmt und an den Werten die Korrektur für die Selbstabsorption vorgenommen.

Zum anderen wurde 1 ml einer 1 m-Hyamin-10-X-Lösung in Methanol (Packard Instrument GmbH) gleichmäßig auf der Zellschicht verteilt, die Kulturplatten danach 5 Minuten bei 60° C erhitzt und 3 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Mit 1 ml Methanol wurden die Proben in ein Glasprobenfläschchen überführt und die Petrischalen mit 1 ml Methanol nachgespült. Die Glasprobenfläschchen wur-

den schließlich mit 12 ml Toluol-Scintillator aufgefüllt und die Radioaktivität im Tri-Carb-Scintillationszähler gemessen. Die Selbstabsorption berücksichtigten wir wie beim säurelöslichen Extrakt.

d) Markierung der DNS

Die Methode der Markierung der DNS entsprach im Prinzip derjenigen, die beim Einbau in die RNS angewendet und beschrieben wurde. Anstelle von C^{14} -Uridin wurden 5 μC H^3 -Thymidin pro Kulturplatte zugegeben.

Die Radioaktivität in der DNS und im säurelöslichen Anteil wurde im Tri-Carb-Scintillationszähler bestimmt.

e) Protein-Markierung

Für die Markierung von Zell- und Virusproteinen wurde C^{14} -1-Leucin verwendet. Die Aufarbeitung der markierten Gewebekulturen geschah wie nach der Markierung der Zell-RNS mit C^{14} -Uridin.

8. RNS-Extraktion (Phenol-Extraktion)

Bei den Versuchen, bei denen die RNS extrahiert werden sollte, wurde die RNS mit 1 μC C^{14} -Uridin pro Kultur für 2 Stunden inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Kulturen

mit NaCl-Phosphatpuffer wurden die Zellschichten von einem Gewebekulturschälchen zusammengekratzt und in 4 ml Lösung, die 0,01 m Acetatpuffer, pH 5,7, und 0,05 % Natrium-Dodecylsulfat enthielt, suspendiert und mit 4 ml Wasser-gesättigtem Phenol bei Raumtemperatur 3 Minuten geschüttelt. Die beiden Phasen wurden anschließend durch Zentrifugation (10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute) voneinander getrennt. Anschließend wurde die Wasserphase entnommen und noch zweimal mit Phenol extrahiert. Zu den gesammelten Wasserphasen wurden 2 Volumenteile kaltes Äthanol (96%) zugesetzt, gut gemischt und bei -20°C (3 Stunden) die RNS präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 3000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten abgeschleudert, einmal mit kaltem Äthanol (96%) gewaschen und schließlich mit 2 ml kaltem NaCl-Phosphatpuffer, pH 7,2 gelöst.

9. Auftrennen der RNS durch Zentrifugation im Saccharose-Gradienten

Die RNS-Lösung (2 ml) wurde auf einem Saccharose-Gradienten (5 - 20 %), der 0,1 m NaCl enthielt, überschichtet und im SW-25 Rotor der Spinco-Zentrifuge mit 24000 Umdrehungen pro Minute für 14 Stunden bei 4°C in Plastikröhrchen zentrifugiert. Fraktionen von je 1 ml wurden durch Abtropfen durch eine am Boden des Röhrchens durchgestoßene Öffnung gesammelt. Die RNS einer jeden Fraktion wurde bei 0°C durch Zugabe von 60 % HClO_4 bis zur Endkonzentration von 4 % aus-

gefällt, die Zentrifugenröhrchen mit 0,4 n HClO₄ aufgefüllt und in der Kälte mit 3000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit 0,4 n HClO₄, einmal mit Äthanol (96%) und schließlich einmal mit Äthyläther gewaschen und nach Entfernung der Ätherreste in 1 ml konzentrierter Ameisensäure aufgelöst. Die Ameisensäure-Lösung dampften wir auf Aluminiumschälchen ein und bestimmten darin die Radioaktivität im Methangasdurchflußzähler.

In einigen Fällen wurde die RNS-Lösung mit 5 µC/ml RNase bei 30° C für 30 Minuten behandelt und darauf hin erst auf den Saccharose-Gradienten überschichtet. Die weitere Aufarbeitung geschah in der vorher angegebenen Weise.

10. Radioaktive Isotope

Verwendet wurden folgende radioaktive Isotopen-Verbindungen, die vom Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen wurden: C¹⁴-Leucin (6 µC/µM), C¹⁴-Uridin (0,12 µC/mg), H³-Uridin (1,44 C/µM), H³-Thymidin (3,00 C/µM).

11. Chemikalien

Das Bayer-Präparat A 139 wurde uns freundlicherweise von den Bayerwerken, Leverkusen, überlassen.

Pankreas-Ribonuclease in Form eines fünfmal kristallisierten Rinderpankreas-Präparates bezogen wir von der Firma Calbiochem, Los Angeles, USA.

12. Kulturmedien

Das Minimalmedium hatte folgende Zusammensetzung:

36,000 g NaCl
2,000 g KCl
0,550 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
10,000 g Glukose
1,000 g CaCl_2
1,000 g MgSO_4
5,500 g NaHCO_3
1,450 g Glutamin
0,080 g Phenolrot
0,250 g Streptomycinsulfat
500 000 I.E. Penicillin
ad 5 l Aqua bidest.

Als Wachstumsmedium wurde ein Lactalbumin- und Hefe-haltiges Medium (Lavit) verwendet, das pro Liter Aqua bidest. folgende Substanzen enthält:

7,200 g NaCl
0,400 g KCl
0,125 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
4,500 g Glukose

0,200 g CaCl_2
0,200 g $\text{Mg SO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
2,200 g NaHCO_3
0,016 g Phenolrot
0,050 g Glutamin
5,000 g Lactalbumin-Hydrolysat
0,100 g Hefeextrakt
1,000 g Vitamin-B-Lösung
0,050 g Streptomycinsulfat
100 000 I.E. Penicillin
150 ml Kälberserum

Die Vitamin-B-Lösung hatte folgende Zusammensetzung:

0,500 g Thiamin $\times\text{HCl}$
0,500 g Riboflavin
0,500 g Pyridoxal $\times\text{HCl}$
0,010 g Folsäure
0,010 g Biotin
ad 100 ml Aqua bidest.

13. Symbole und Abkürzungen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Symbole und Abkürzungen verwendet:

* = Die Werte für den Einbau von C^{14} -Uridin (0,25 μC /Kultur) in die Zell-RNS (-o-o-) bzw. in den säurelöslichen Anteil (- Δ - Δ -) sind als Verhältnis von infizierten zu nicht-

infizierten Kulturen (N/No) dargestellt.

- = Die Werte für den Einbau von C^{14} -Leucin ($0,25 \mu C/Kultur$) in das Zell-Protein (-o-o-) sind als Verhältnis von infizierten zu nichtinfizierten Kulturen dargestellt.

RNS = Ribonukleinsäure

DNS = Desoxyribonukleinsäure

S. = Säurelöslicher Anteil

St. = Standardvirus

I.P.M. = Impulse/Minute

O.D. = Optische Dichte

Inf. = Infizierte Kulturen

Ko. = Nichtinfizierte Kulturen

p.i. = post infectionem

RNase = Ribonuclease

KP-Virus = Virus der Klassischen Geflügelpest

IV. Untersuchungsergebnisse

A. Beeinflussung des Stoffwechsels der Wirtszelle mit komplettem, infektiösem KP-Virus

1. RNS-Stoffwechsel

a) Einbauversuche

Als Maß für die Beeinflussung des Stoffwechsels durch irgendwelche Noxen wird sehr oft der Einbau von radioaktiv markierten Vorläufern in wichtige Makromoleküle der Zel-

len, wie RNS, DNS oder Proteine oder in deren Bausteine herangezogen. Um entsprechende Aussagen über die Wirkung der Infektion mit dem Virus der Klassischen Geflügelpest (KP-Virus) auf embryonale Hühnerzellen machen zu können, verwendeten wir einmal den Einbau von C^{14} -Uridin in die RNS bzw. das Sammelbecken der löslichen RNS-Vorläufer (säurelöslicher Pool der Wirtszelle). Der säurelösliche Pool besteht nach Verabreichung von C^{14} -Uridin aus markierten Uridin-Phosphaten, deren Bildung eine Aussage über die Penetration der Isotopenverbindung in die Zelle bzw. über die Intaktheit des Energiestoffwechsels zulassen. In sehr vielen Fällen ist die Veränderung des Einbaus von markierten Vorläufern in entsprechende Makromoleküle einfach auf eine Veränderung der Bereitstellung des letzten Vorläufers - in unserem Falle Uridin-Triphosphat - zurückzuführen und hat mit der eigentlichen Synthese-Kapazität des Makromoleküls nichts zu tun. Ein entsprechendes Beispiel wird in Abbildung 1 wiedergegeben. Wie daraus hervorgeht, findet man 3 Stunden nach der Infektion von embryonalen Hühnerzellen mit dem KP-Virus ein Maximum des Einbaus von C^{14} -Uridin in die RNS der Wirtszelle. Ein deutliches Maximum läßt sich zur selben Zeit ebenfalls bei der Markierung des säurelöslichen Pools feststellen. Das bedeutet, daß die Stimulierung des Einbaus des Isotops in die RNS zu einem großen Teil - nicht vollständig - auf einer Erhöhung der Markierung des säurelöslichen Pools zurückzuführen ist und nicht eine verstärkte RNS-Synthese reflektiert.

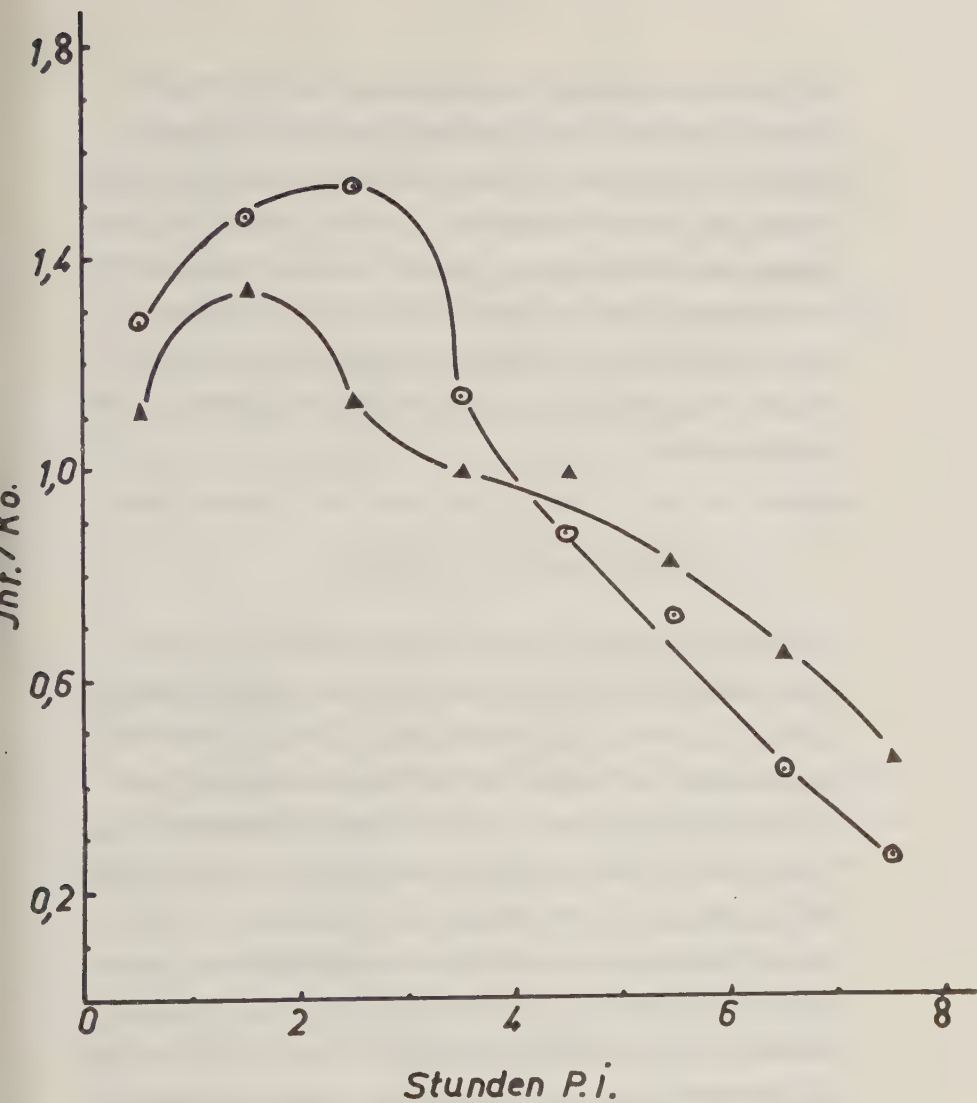


Abb. 1

*Veränderungen des RNS-Stoffwechsels in embryonalen Hühnerzellen nach Infektion mit Standard-KP-Virus.

Der spätere Abfall der Einbaurrate in die RNS der infizierten Wirtszelle geht annähernd parallel mit dem Abfall der Markierung des säurelöslichen Pools. Auch hier handelt es sich offensichtlich nicht um eine spezifische Hemmung der RNS-Synthese, sondern um eine allgemeine Verschlechterung der Stoffwechsellage der infizierten Zelle. Dieser späte Abfall in der Markierung kann deshalb als Maß für den cytopathogenen Effekt der Virusinfektion verwendet werden.

b) Saccharose-Gradienten-Versuche

Im vorigen Abschnitt wurde eine Untersuchung des RNS-Stoffwechsels der infizierten Zelle auf quantitativer Basis durchgeführt. Von Interesse war es nun, ob sich die neugebildete und deshalb mit C^{14} -Uridin markierte RNS in der infizierten Zelle in ihrem Molekulargewicht signifikant von der RNS nichtinfizierter Zellen unterscheidet. Es ist bekannt, daß im Maximum der Virus-RNS-Synthese (etwa 2 - 3 Stunden p.i.) etwa 30 % der gesamten in der infizierten Zelle neu synthetisierten RNS aus Virus-RNS besteht (Scholtissek und Rott, 1961). Weiterhin weiß man, daß der RNS-Gehalt pro Viruspartikel einem Molekulargewicht von 2×10^6 entspricht (Frisch - Niggemeyer, 1956), obwohl es bis jetzt noch nicht möglich war, eine hochmolekulare RNS aus diesen Viren zu isolieren und der Verdacht geäußert wurde, daß die RNS im Viruspartikel selbst schon in kleinen Bruchstücken vorliegt (Hirst, 1962).

Mit Hilfe der Saccharose-Gradienten-Zentrifugation ist es möglich, relativ einfach eine Auftrennung der RNS entsprechend des Molekulargewichtes vorzunehmen. In unserem Falle wurde die RNS der infizierten Zellen mit Hilfe von C^{14} -Uridin von 1 - 3 Stunden p.i., der Zeit der maximalen Virus-RNS-Synthese, markiert, mit Phenol isoliert und im Saccharose-Gradienten aufgetrennt (Abb. 2a). Als Vergleich dienten entsprechend markierte, nicht infizierte Kontrollkulturen (Abb. 2b). (Während der zweistündigen Markierungszeit verläuft der Einbau in die RNS annähernd linear!).

Wie aus den Abbildungen 2a und 2b ersichtlich ist, besteht zwischen der RNS infizierter und nichtinfizierter Kulturzellen kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Molekulargewichtsverteilung der RNS. Sowohl die beiden ribosomalen RNS-Fractionen mit den Svedberg-Konstanten von 26 bzw. 17 S als auch die lösliche RNS (4 S) und die Boten-RNS (8 - 10 S), sind in beiden Fällen deutlich markiert. Eine RNS mit einer Svedberg-Konstanten von etwa 30 S, wie man sie bei einer RNS mit einem Molekulargewicht von 2×10^6 erwarten sollte, wurde nicht gefunden. Das bedeutet, daß die Virus-RNS in der infizierten Zelle entweder, wie verschiedentlich vermutet wurde, bereits in kleineren Stücken anfällt, oder aber daß die hier angewendete Phenol-Methode nicht in der Lage war, die Virus-RNS aus den Zellkernen, in denen sie gebildet wird (Scholtissek et al., 1962), zu extrahieren. In einigen Experi-

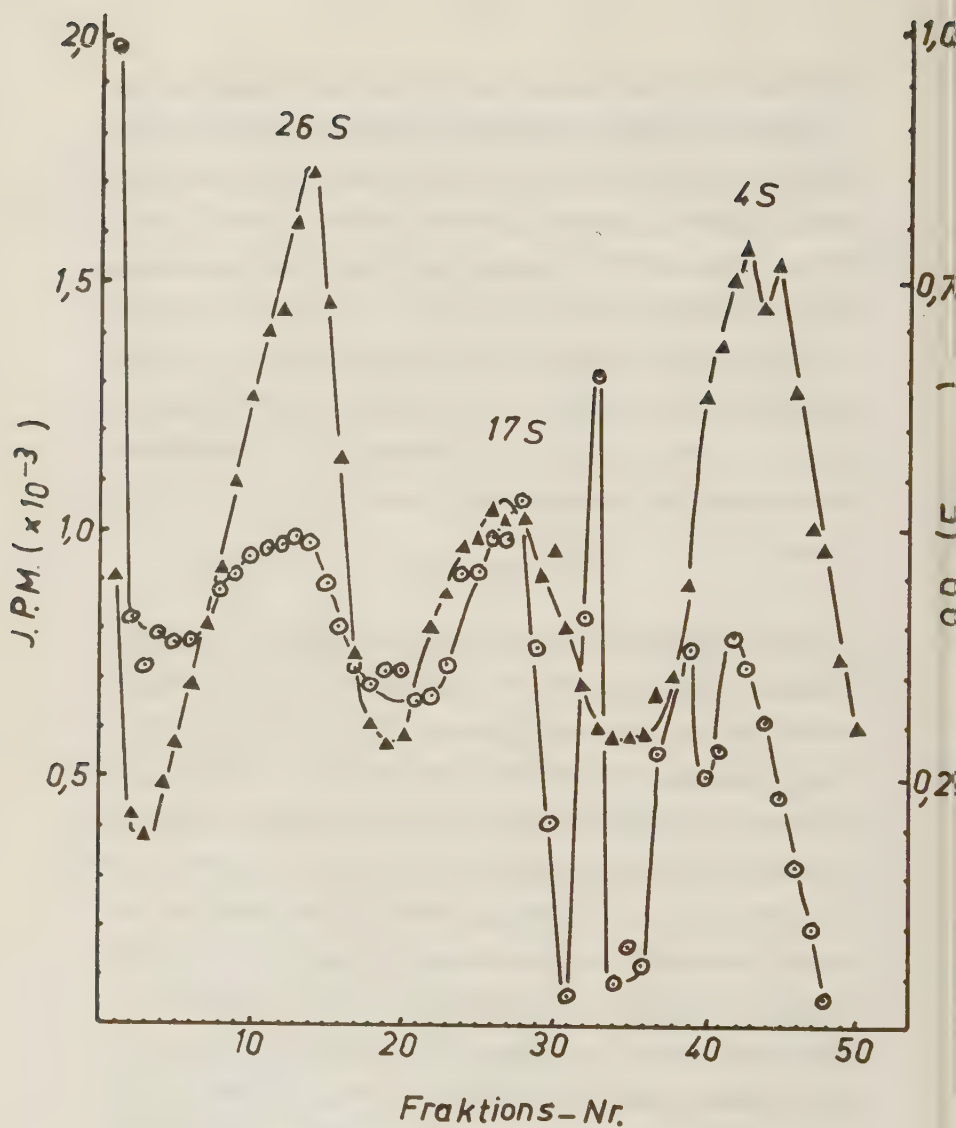


Abb. 2a

Auftrennung der RNS KP-Virus-infizierter Zellen im Saccharose-Gradienten. Puls von 1 - 3 Std. p.i.

-o-o- = Radioaktivität

-Δ-Δ- = O.D.

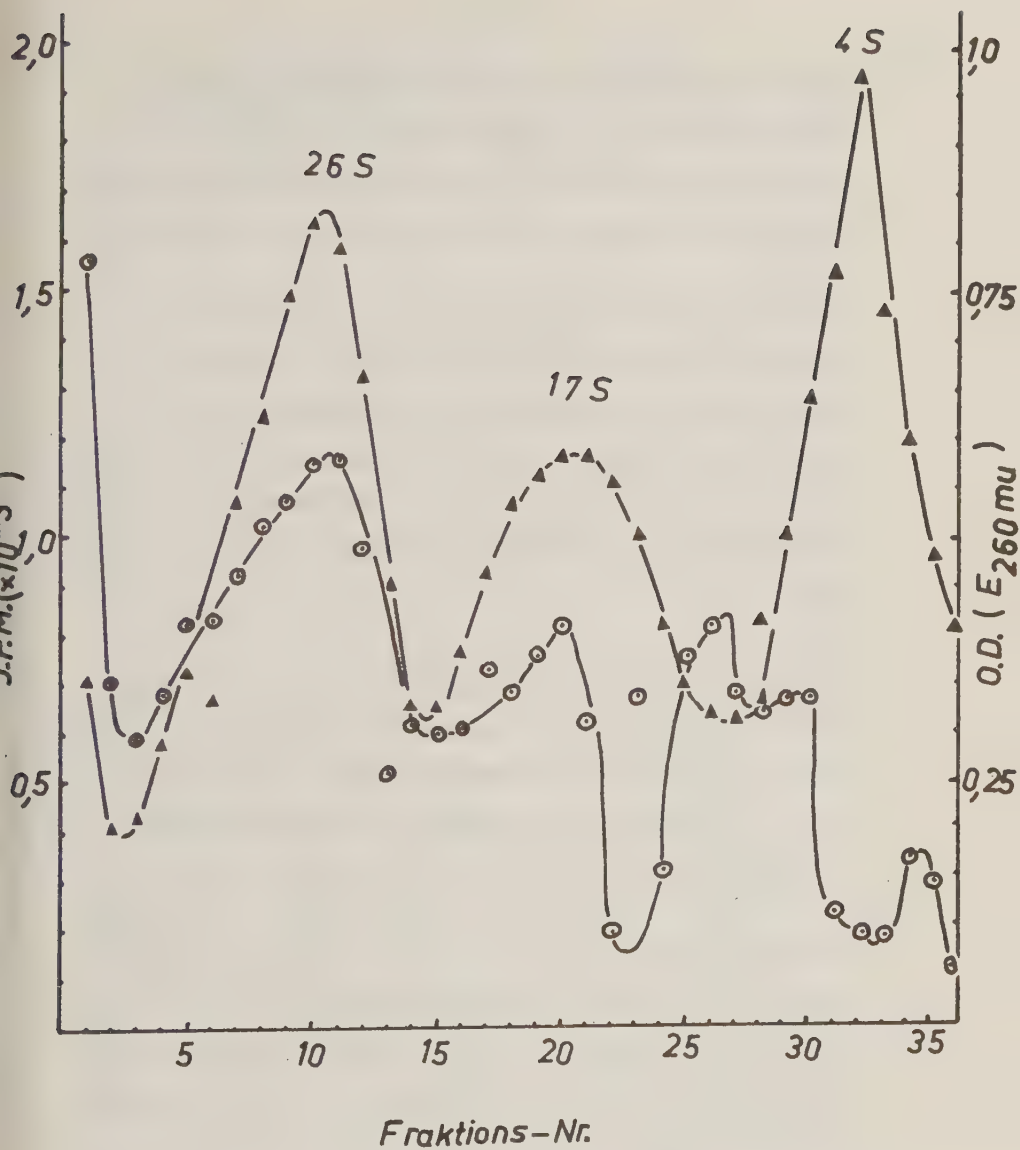


Abb. 2b

Auftrennung der RNS nichtinfizierter Zellen im Saccharose-Gradienten. Puls entsprechend Abb. 2a.

-o-o- = Radioaktivität

-Δ-Δ- = O.D.

menten in denen härtere Methoden zur RNS-Extraktion angewendet wurden (z.B. Temperaturerhöhung), trat teilweise ein Abbau der RNS auf, so daß uns ein Angriff dieses Problems in dieser Richtung nicht ratsam erschien.

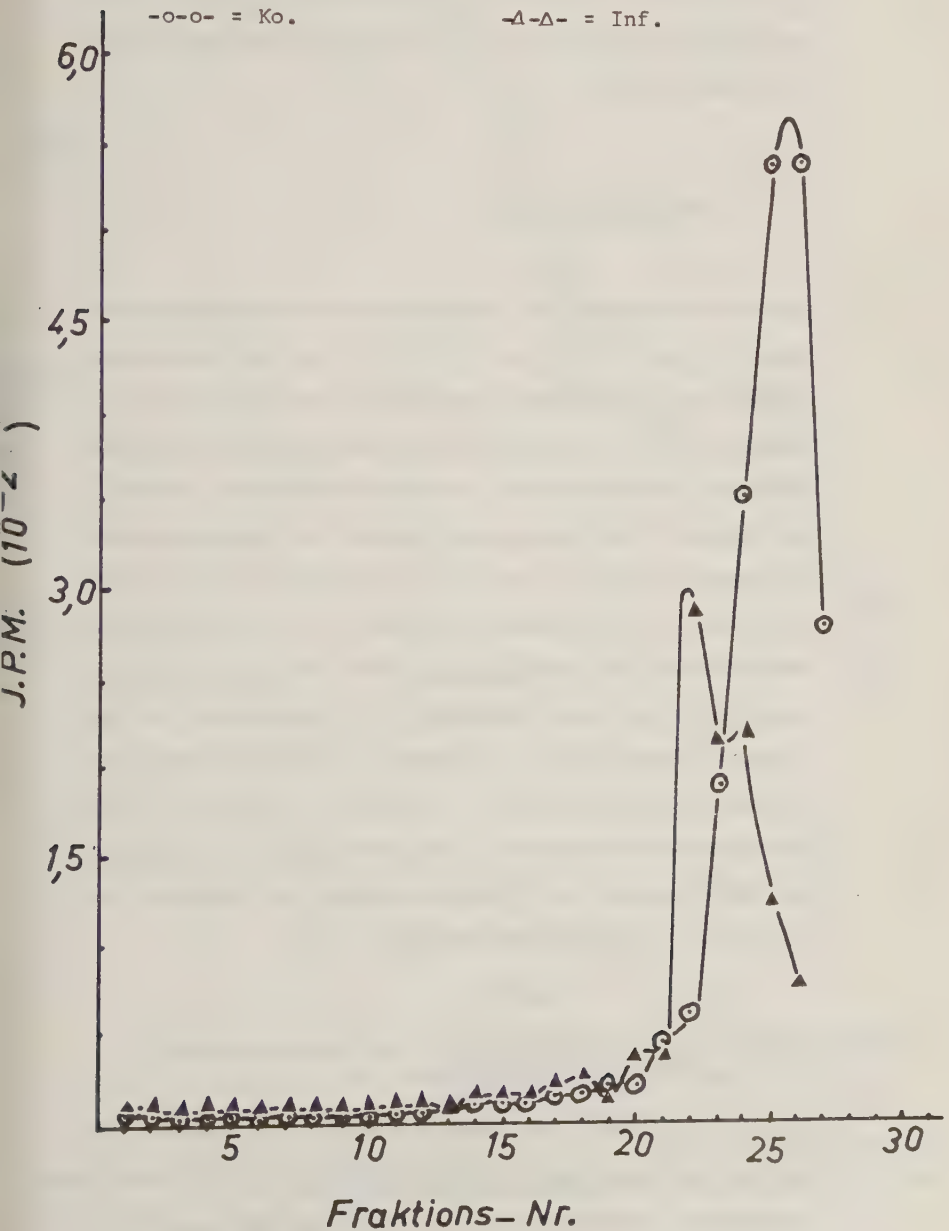
Bei kleineren RNS-haltigen Viren, z.B. dem EMC-Virus (Montagnier und Sanders, 1963) wurde als replikative Form eine Doppelstrang-RNS aus dem Cytoplasma der infizierten Zellen isoliert. Solch eine Doppelstrang-RNS ist gegen Pankreas-RNase stabil, so daß ihre Isolierung durch Behandeln der markierten, isolierten RNS relativ einfach ist.

Wir versuchten eine solche replikative Form der Virus-RNS in infizierten Zellen auf ähnliche Weise darzustellen, indem wir die KP-infizierten Zellen mit C^{14} -Uridin von 1 - 3 Stunden p.i. markierten, die RNS mit Phenol extrahierten, mit Pankreas-RNase behandelten und auf dem Saccharose-Gradienten auftrennten (Abb. 3). Mit Hilfe dieser Methode gelang es, nur eine sehr kleine Fraktion der RNS mit einer Svedberg-Konstanten von 4 S zu gewinnen. Das bedeutet, daß diese replikative Form, wenn überhaupt, nur in sehr kleinen Mengen und dann in niedermolekularer Form in der infizierten Zelle vorkommt.

Auch hier gilt in Bezug auf die Phenol-Extraktions-Methode das oben Gesagte. Beim EMC-Virus verläuft die Synthese der replikativen Form im Cytoplasma der Wirtszelle und

Abb. 3

Auftrennung der RNS infizierter und nichtinfizierter Zellen im Saccharose-Gradienten nach Ribonuclease-Behandlung. Puls entsprechend Abb. 2a.



läßt sich deshalb relativ einfach isolieren. Die replikative Form des KP-Virus muß dagegen im Zellkern erwartet werden. Dementsprechend ist ihre Isolierung wesentlich schwieriger.

2. DNS-Stoffwechsel

Als nächstes wurde die Beeinflussung des DNS-Stoffwechsels der Wirtszelle durch die KP-Virus-Infektion untersucht. Wir prüften dabei den Einbau von H^3 -markiertem Thymidin in die DNS und in den säurelöslichen Pool. Aus Abbildung 4 geht hervor, daß die Stimulierung und anschließende Inhibierung des Einbaus des Isotops in die DNS parallel mit der Kurve, die den Einbau in den säurelöslichen Pool beschreibt, verläuft. Eine signifikante Beeinflussung der DNS-Synthese durch die Infektion wurde also nicht gefunden. Lediglich die Penetration der Isotopenverbindung und die allgemeine Stoffwechsellage der Wirtszelle werden durch die Infektion verändert. Dieser Befund steht im Gegensatz zur spezifischen Inhibierung der DNS-Synthese der Wirtszellen nach der Infektion mit dem ME-Virus (Scholtissek et al., 1962).

3. Protein-Stoffwechsel

Die Beeinflussung des Proteinstoffwechsels durch die Infektion von embryonalen Hühnerzellen mit dem KP-Virus wurde bereits beschrieben (Scholtissek und Rott, 1965). Da

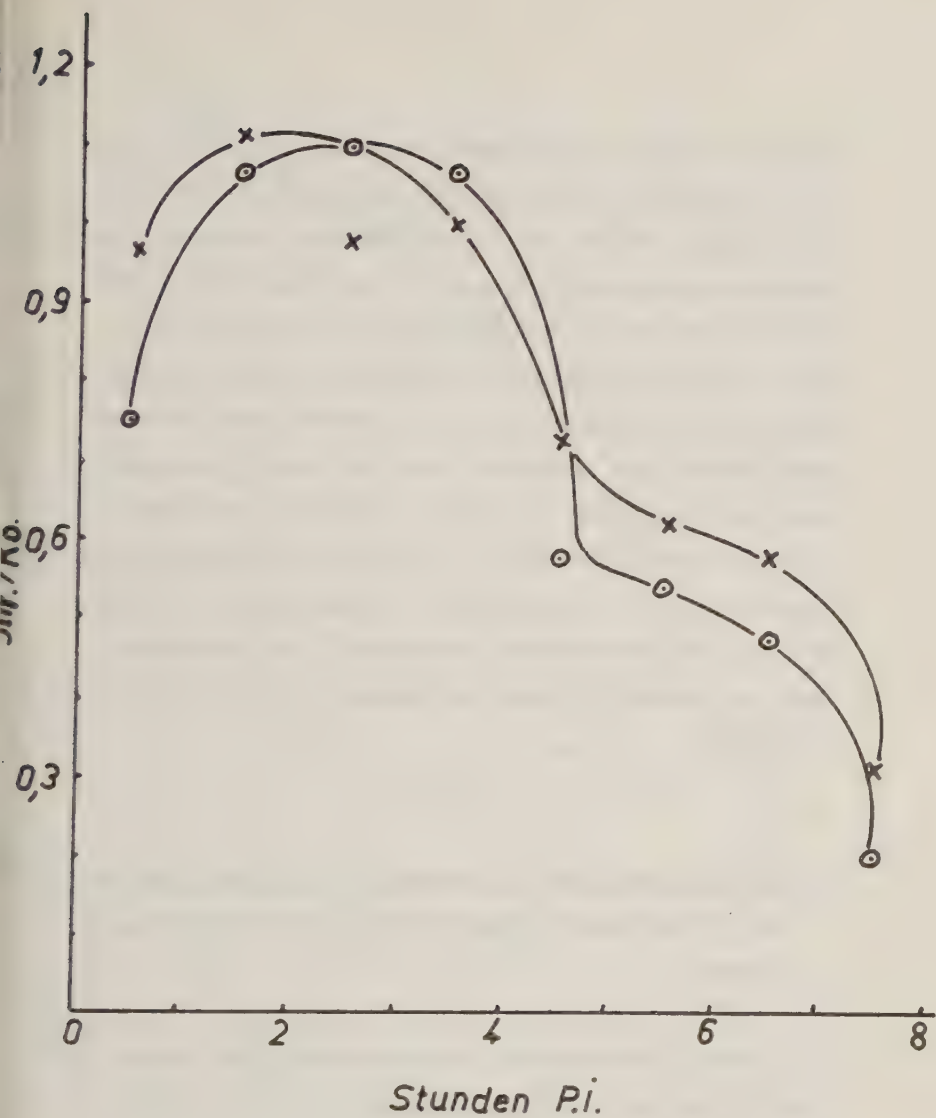


Abb. 4

Veränderungen des DNS-Stoffwechsels in embryonalen Hühnerzellen nach Infektion mit Standard-KP-Virus.

Die Werte für den Einbau von H^3 -Thymidin ($5 \mu C$ pro Kulturplatte) in die Zell-DNS (o-o-) und in den säurelöslichen Teil (x-x-) sind als Verhältnis von infizierten zu nicht-infizierten Kulturen dargestellt.

der späte Abfall des Einbaus von C^{14} -Leucin in das Protein infizierter Zellen im folgenden als Maß für den cytopathogenen Effekt der Virus-Infektion herangezogen werden sollte, wurden die entsprechenden Experimente hier nochmals wiederholt und dabei die von Scholtissek und Rott (1965) veröffentlichten Befunde bestätigt (siehe Abb. 5). Wie bei der RNS-Synthese dürfte auch hier der späte Abfall der Einbaurates eher auf einer Verschlechterung der allgemeinen Stoffwechsellage der infizierten Zellen zurückzuführen sein, als auf eine spezifische Inhibierung der Protein-Synthese der Wirtszelle. Die Penetration des radioaktiven Vorläufers in die Wirtszelle kann in diesem Falle aus technischen Gründen nicht gemessen werden.

B. Beeinflussung des Stoffwechsels der Wirtszellen nach der Infektion mit inkomplettem, nichtinfektiösem KP-Virus

Die bisher erhaltenen Untersuchungsergebnisse zeigen eindeutig, daß der RNS-, Protein- und DNS-Stoffwechsel, der mit KP-Virus infizierten Zellen nicht sofort nach der Infektion zum Erliegen kommt. Es erhebt sich daher die Frage, welche Faktoren in der virusinfizierten Zelle für den cytopathogenen Effekt verantwortlich gemacht werden können. Wir versuchten diese Frage mit Hilfe von KP-Virus-Präparationen anzugehen, die in ihrem genetischen Material

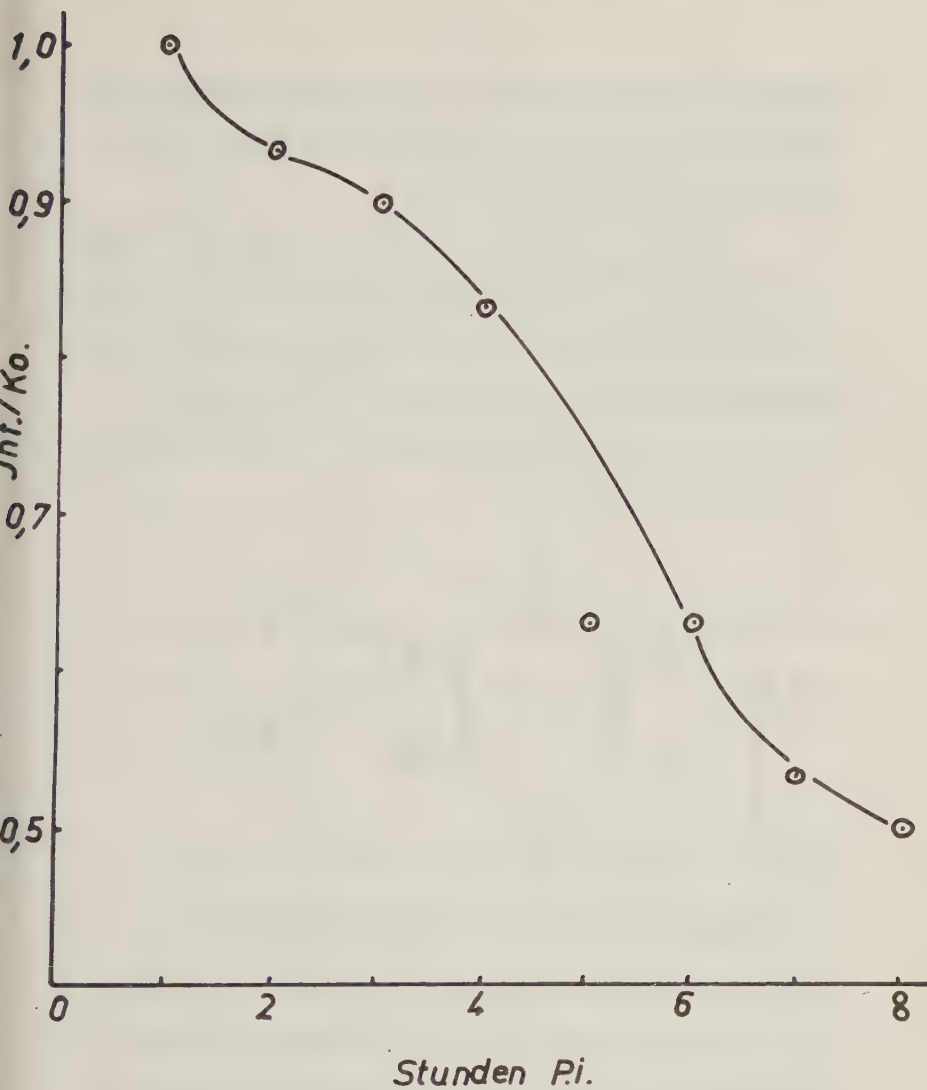
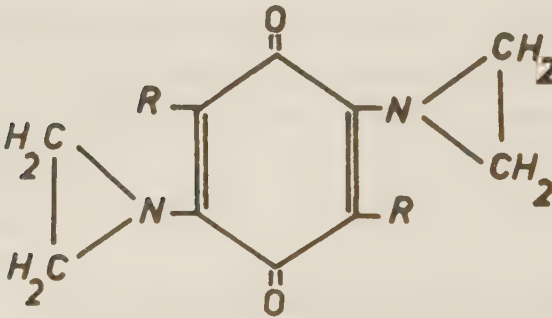


Abb. 5

- Einbau von C^{14} -Leucin in das Protein KP-Virus-infizierter Zellen zu verschiedenen Zeiten p.i.

partiell inaktiviert wurden. Wie bereits eingang erwähnt, bieten sich für die partielle Inaktivierung der Viruspräparationen zwei Möglichkeiten an:

Einmal gelingt die stufenweise Inaktivierung durch chemische Veränderung des genetischen Materials des KP-Virus mit Hilfe des Iminochinons Bayer A 139 oder durch Hydroxylamin (Scholtissek und Rott, 1963; 1964). Für unsere Untersuchungen verwendeten wir das Bayer-Präparat A 139, welches folgende Formel hat:



R = Gruppe, die das Molekül wasserlöslich macht.

Bei der Reaktion des Bayer-Präparates mit Nukleinsäuren gehen die Äthylenaminringe auf und bilden mit der RNS hauptsächlich Triester, die als solche instabil sind und zerfallen. Dabei wird das Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNS zerbrochen (Scholtissek, 1957). Proteine werden bei dieser Reaktion nicht angegriffen. Die Inaktivierung der Virusvermehrung folgt dabei weitgehend einer Reaktion erster Ordnung (Scholtissek et al., 1962).

Zum anderen kann man die Influenzaviren durch fortlaufende, unverdünnte Passagen inaktivieren (v. Magnus-Phänomen) (v. Magnus, 1951). Nach der zweiten unverdünnten Passage entstehen Viruspartikel, die wie bereits erwähnt, nur noch etwa 50 % oder weniger ihres normalen Gehaltes an Virus-RNS bzw. RNP-Antigens enthalten und weitgehend ihre Infektiosität eingebüßt haben. Diese sogenannten inkompletten Viren sind aber noch in der Lage, die einzelnen Virus-Untereinheiten zu synthetisieren. Nach neueren Untersuchungen sind diese Viren inkomplett im genetischen Sinne, d.h. bei jeder unverdünnten Passage verlieren sie, anfangen von einem Ende, nach und nach ein Stück ihrer RNS. Im Gegensatz zur chemischen Inaktivierung, die ein Zufallsprozeß ist, geschieht diese biologische Inaktivierung in einer bestimmten Richtung (Rott und Scholtissek, 1963; Scholtissek et al., 1966).

Da man mit Hilfe beider Methoden die Synthese der einzelnen Virusuntereinheiten nacheinander ausschalten kann, eignen sie sich besonders gut zum Studium der Frage, ob eine dieser Untereinheiten einen spezifischen cytopathogenen Effekt verursacht.

1. Studien mit chemisch inaktivierten Viren

Bei diesen Untersuchungen wurden durch Zentrifugieren konzentriertes KP-Virus bei pH 6,7 entsprechend der unter Material und Methoden angeführten Angaben mit Bayer-Präparat

A 139 inaktiviert. Die Inaktivierungszeiten wurden nach den Erfahrungen von Scholtissek und Rott (1964) gewählt, so daß es zu einer stufenweise Ausschaltung der einzelnen Synthese-Kapazitäten kommt. Für die Infektion der Gewebekulturzellen wurde eine so hohe Multiplizität gewählt, daß nahezu alle Wirtszellen mit dem Virus infiziert wurden.

a) RNS-Stoffwechsel

In Abbildung 1 wurde gezeigt, daß zwischen 2 und 3 Stunden p.i. ein maximaler Einbau von C^{14} -Uridin in die RNS infizierter Zellen erfolgt. Es ist bekannt, daß dieser erhöhte Einbau nicht nur auf einer Erhöhung des Einbaus in den säurelöslichen Pool beruht, sondern auch durch eine zusätzliche Synthese der Virus-RNS bedingt ist (Scholtissek und Rott, 1961). Später nimmt der Einbau dieses Isotops mehr und mehr ab, was offensichtlich mit dem cytopathogenen Effekt zusammenhängt. Aus diesem Grunde wurde versucht, die Veränderung des Einbaus von C^{14} -Uridin in die RNS infizierter Zellen, verglichen mit nicht-infizierten Kontrollzellen, in Abhängigkeit von dem Inaktivierungsgrad der Viruspräparation zu messen. Dabei wurden die Pulse mit dem radioaktiven Uridin entweder zwischen 2 - 3 Stunden p.i. getestet, um die Fähigkeit zur Virus-RNS-Synthese zu messen, oder von 4 - 5 bzw. 6 - 7 Stunden p.i., um ein Maß für den cytopathogenen Effekt zu haben.

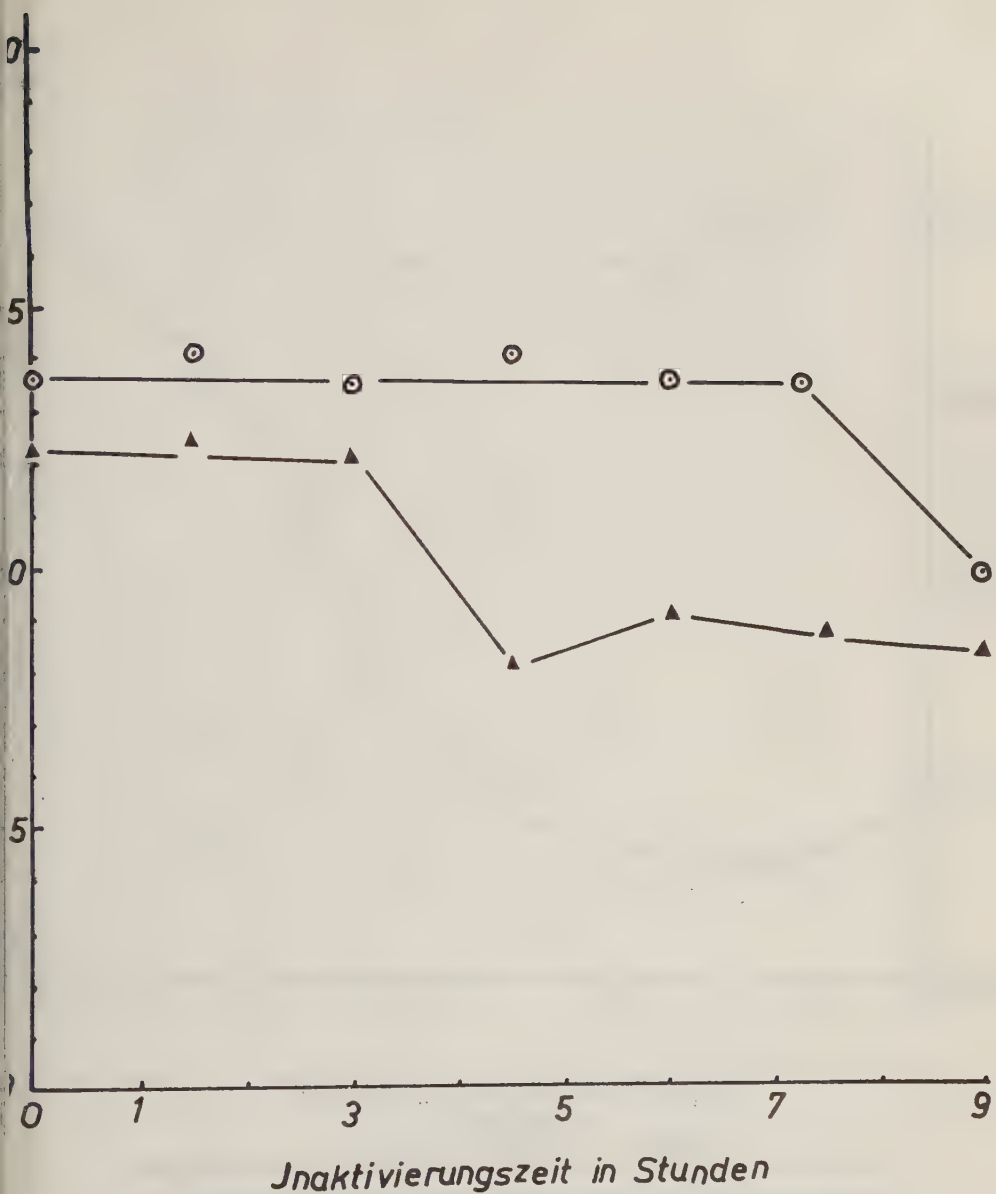
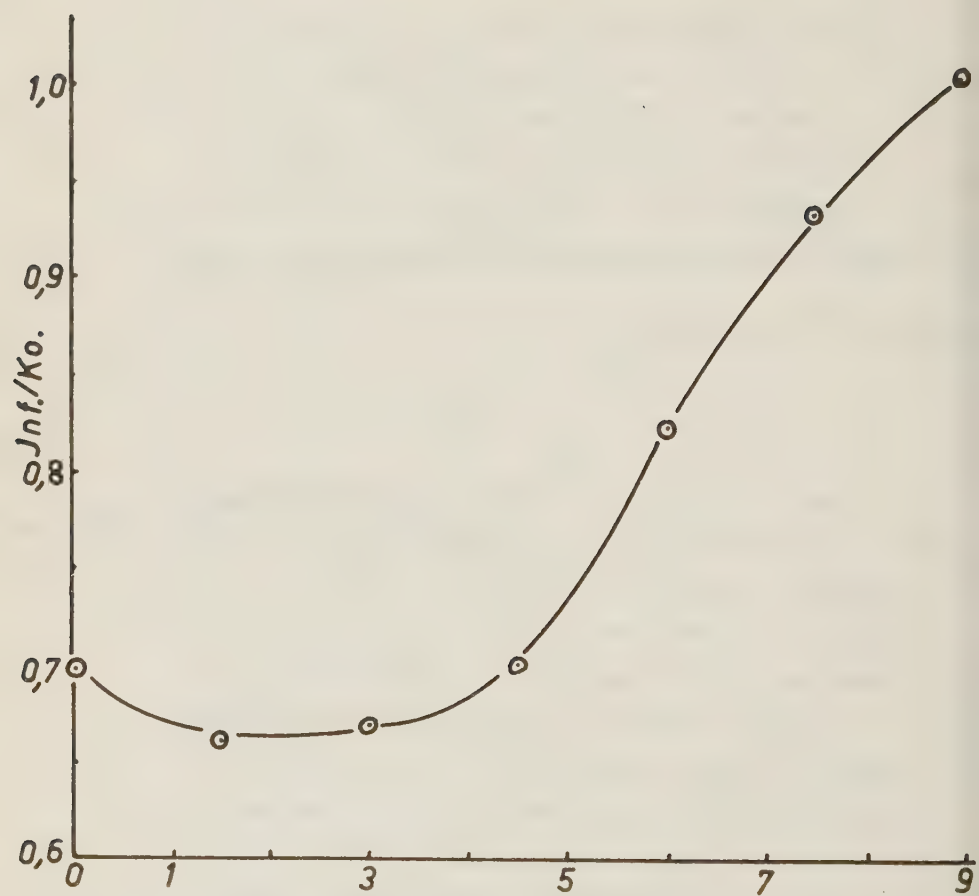


Abb. 6a

* Markierung der RNS und des säurelöslichen Teils in embryonalen Hühnerzellen, die mit partiell inaktiviertem KP-Virus infiziert wurden. Puls von 2 - 3 Stdn. p.i.



Inaktivierungszeit in Stunden

Abb. 6b

Einbau von C^{14} -Uridin in die RNS von embryonalen Hühnerzellen, die mit partiell inaktiviertem KP-Virus infiziert wurden.

Puls von 4 - 5 Stdn. p.i.

Die Werte für den Einbau von C^{14} -Uridin ($0,25 \mu C$ pro Kulturplatte) in die Zell-RNS (-o-o-) sind als Verhältnis von infizierten zu nichtinfizierten Kulturen dargestellt.

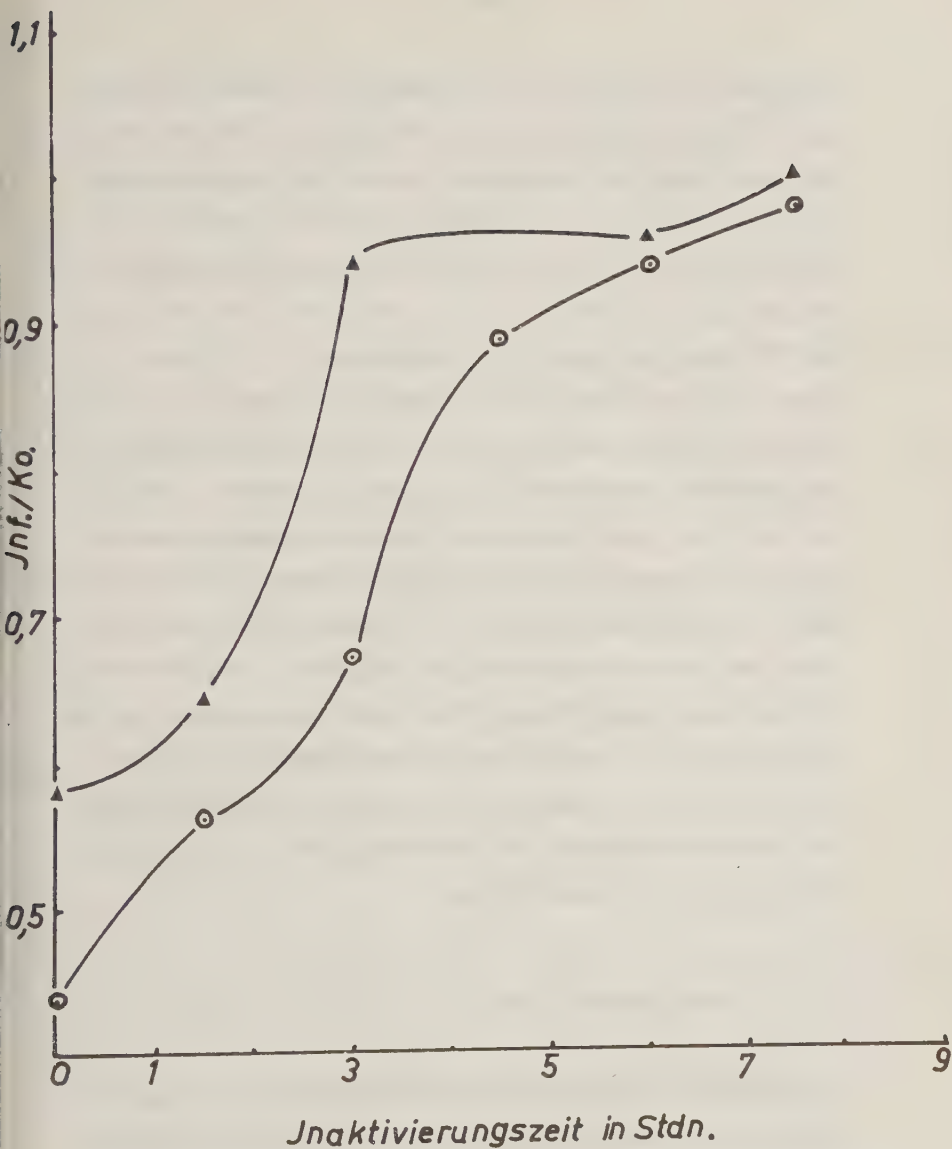


Abb. 6c

*Markierung der RNS und des säurelöslichen Teils in embryonalen Hühnerzellen, die mit partiell inaktiviertem KP-Virus infiziert wurden. Puls von 6 - 7 Stdn. p.i.

Abbildung 6a zeigt, daß zur Aufhebung des erhöhten Einbaus von C^{14} -Uridin zwischen 2 und 3 Stunden p.i. in den säurelöslichen Pool der infizierten Zellen eine Inaktivierung des Virus von etwa 4 1/2 Stunden ausreicht, während ein erhöhter Einbau in die RNS erst nach einer Inaktivierung des KP-Virus von etwa 9 Stunden verhindert wird. Wenn man den C^{14} -Puls erst von 4 - 5 Stunden bzw. 6 - 7 Stunden p.i. setzt, wird der verringerte Einbau in die RNS der infizierten Zelle bereits nach etwa 4 1/2 Stunden Inaktivierung der zur Infektion verwendeten Virusproben aufgehoben (Abb. 6b und 6c). Wie in der Diskussion noch näher auseinandergesetzt wird, entspricht die Inaktivierungszeit, die benötigt wird, um den Mehreinbau beim 2 - 3 Stunden-Puls zu verhindern, der Inaktivierungszeit, die notwendig ist, die Virus-RNS-Synthese auszuschalten. Die Inaktivierungszeit, die benötigt wird, die Inhibierung der RNS-Synthese bei einem 4 - 5 bzw. 6 - 7 Stunden-Puls aufzuheben, entspricht etwa der Inaktivierungszeit, die notwendig ist, um die Neuramidase-Synthese auszuschalten.

b) Proteinstoffwechsel

In Abbildung 5 wurde gezeigt, daß auch der Einbau von C^{14} -Leucin in das Protein der Wirtszelle durch die Infektion stark gehemmt wird. Deshalb wurden entsprechende Versuche wie sie mit C^{14} -Uridin beschrieben wurden, auch mit C^{14} -Leucin durchgeführt. Abbildung 7 zeigt, daß auch für die Aufhebung der Inhibierung des C^{14} -Leucin-Einbaus bei einem

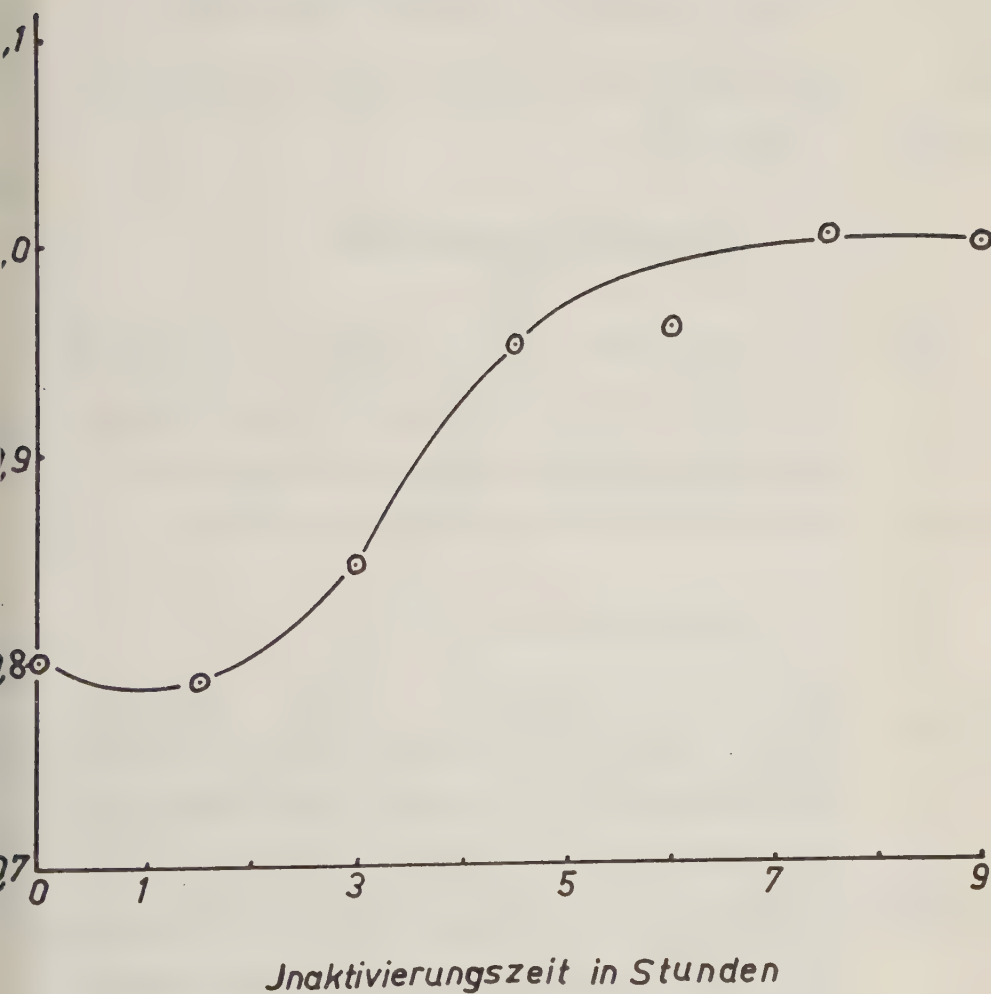


Abb. 7

- Einbau von C^{14} -Leucin in das Protein von embryonalen Hühnerzellen, die mit partiell inaktiviertem KP-Virus infiziert wurden.
Puls von 6 - 7 Std. p.i.

Puls von 6 - 7 Stunden p.i. die verwendeten Virusproben für etwa 4 1/2 Stunden inaktiviert werden müssen.

Die Ergebnisse entsprechen also denen, die mit C^{14} -Uridin gewonnen wurden.

2. Biologisch inaktiviertes Virus

Die v. Magnus-inkompletten Viruspräparate wurden durch unverdünnte Passagen des KP-Virus in embryonierten Hühnereiern, wie unter Material und Methoden angeführt, gewonnen. Die Multiplizität der Infektion wurde so gewählt, daß jede Zelle mindestens ein Viruspartikel aufnahm.

a) RNS-Stoffwechsel

Die Untersuchungen über die Beeinflussung des RNS-Stoffwechsels wurden genau so durchgeführt, wie das in Kapitel B 1a beschrieben wurde. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse wiedergegeben. Daraus geht hervor, daß sich die Abnahme des Einbaus von C^{14} -Uridin in die RNS infizierter Zellen bei einem Puls von 6 - 7 Stunden p.i. sehr stark verringert, wenn KP-Virus der zweiten unverdünnten Passage verwendet wurde. Bei der Infektion mit Viruspräparaten der dritten unverdünnten Passage ist der RNS-Stoffwechsel annähernd normal. Ähnliche Befunde wurden auch erhalten, als der säurelösliche Pool untersucht wurde.

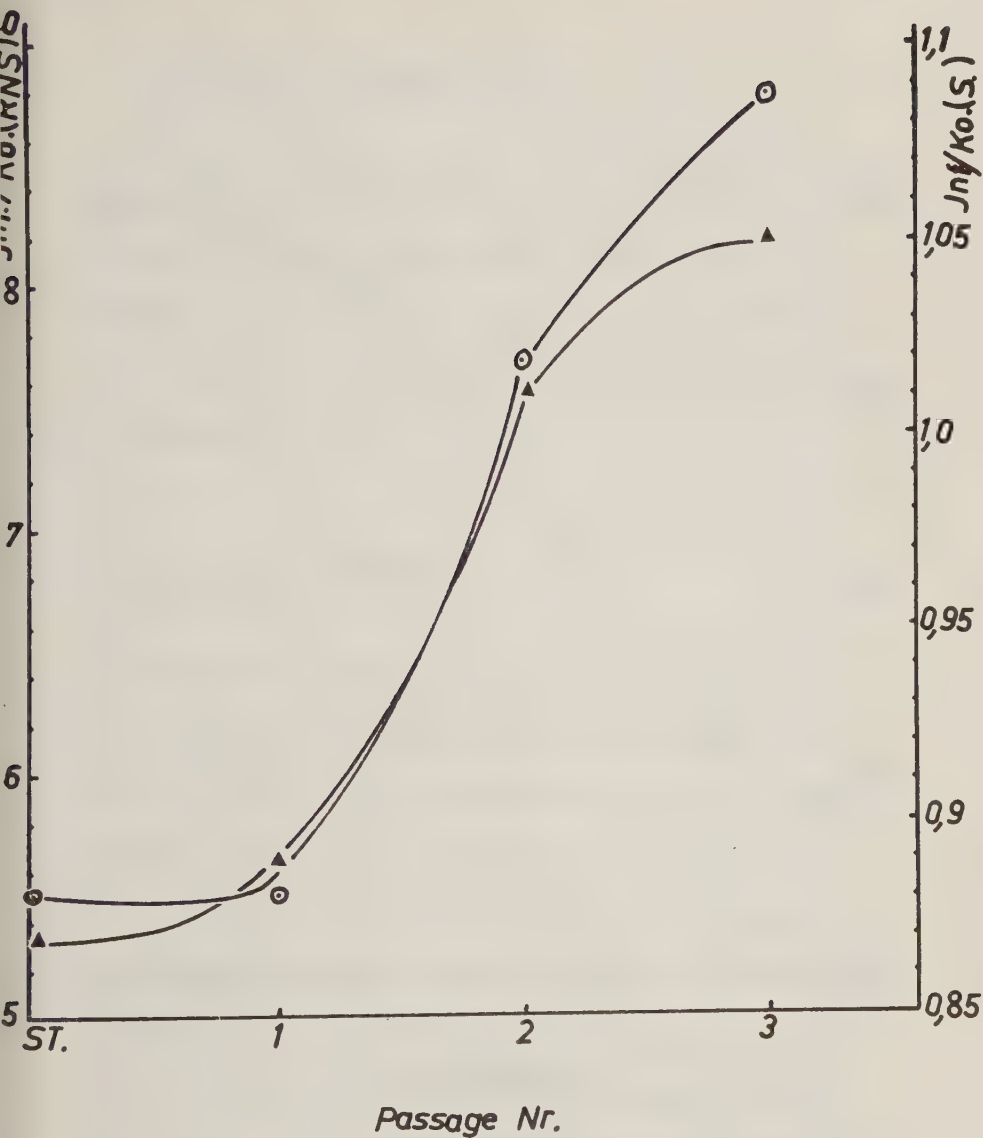


Abb. 8

• Veränderung des Einbaus von C^{14} -Uridin in die RNS und den säurelöslichen Teil von Zellen, die mit Standard- und inkomplettem KP-Virus infiziert wurden. Puls von 6 - 7 Stdn. p.i.

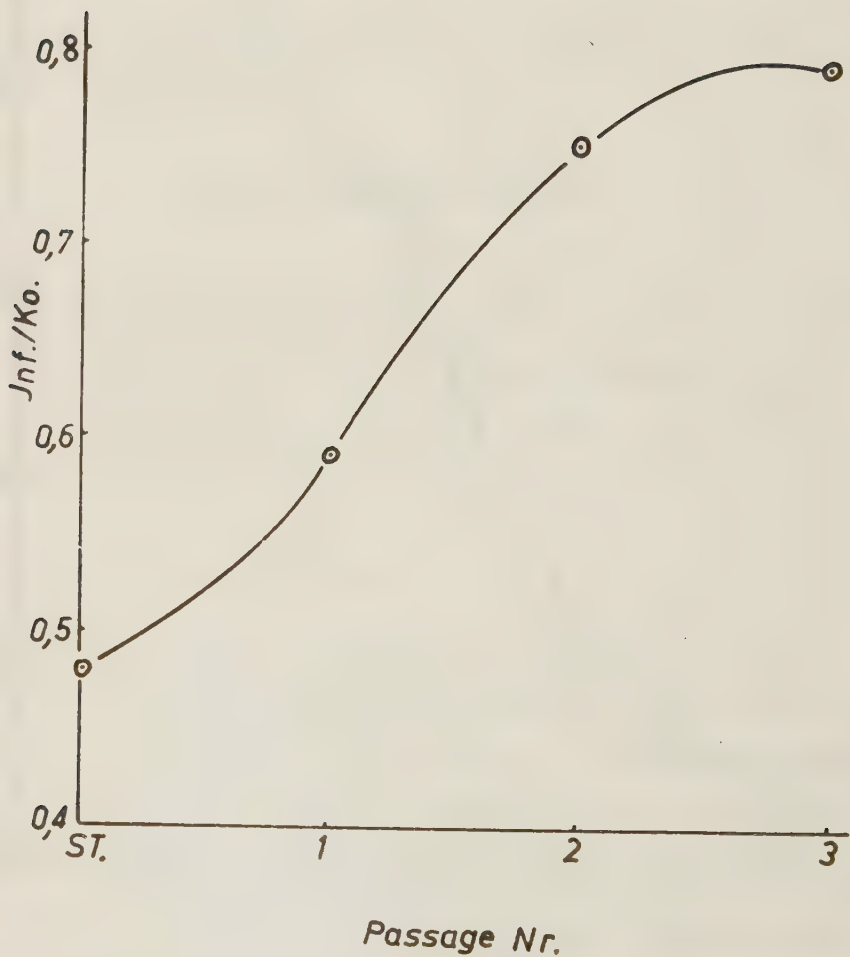


Abb. 9

- Markierung des Proteins von embryonalen Hühnerzellen, die mit Standard- und inkomplettem KP-Virus infiziert wurden.
Puls von 6 - 7 Stdn. p.i.

b) Proteinstoffwechsel

Der Proteinstoffwechsel wurde mit Hilfe des Einbaus von C^{14} -Leucin untersucht. Dafür wurde dieselbe Methode angewendet wie sie beim RNS-Stoffwechsel beschrieben wurde. Abbildung 9 zeigt, daß die Proteinstoffwechselveränderungen in Abhängigkeit von der Anzahl der unverdünnten Passagen sich genau so verhalten wie die RNS-Stoffwechselveränderungen.

V. Besprechung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen zunächst die bereits von Scholtissek und Rott (1961, 1965) erhaltenen Befunde über den RNS- und Proteinstoffwechsel von Zellen, die mit dem zu den Influenzaviren gehörenden KP-Virus infiziert wurden. In Übereinstimmung mit den genannten Autoren wurde gefunden, daß in dem gewählten System der RNS- und Proteinstoffwechsel der infizierten Zelle zunächst nicht abgeschaltet wird. Bei der quantitativen Auswertung der eigenen Untersuchungsbefunde ergab sich zunächst eine Diskrepanz zu den früher mit P^{32} durchgeführten Untersuchungen über das Verhalten des RNS-Stoffwechsels (Scholtissek und Rott, 1961). Früher wurde eine 20 - 30 %ige Erhöhung der Einbaurate von P^{32} in die RNS KP-Virus-infizierter Zellen im Maximum der Virus-RNS-Synthese (3 Stdn. p.i.) gefunden. Diese Erhöhung entsprach genau der zu dieser Zeit

erfaßten relativen Menge an Virus-RNS in infizierten Zellen. In den hier beschriebenen Ergebnissen war die Erhöhung des Einbaus von C^{14} -Uridin in die RNS infizierter Zellen zur entsprechenden Zeit etwa doppelt so hoch (siehe Abb. 1). Bei der Bestimmung des Pools der RNS-Vorläufer (TCE-Pool) nach Gaben von C^{14} -Uridin zeigte sich, daß etwa die Hälfte der Erhöhung des Einbaus in die RNS auf eine Erhöhung der Markierung des Vorläufer-Pools durch die Infektion zurückzuführen ist (Abb. 1). Diese Erhöhung des Pools durch die Infektion dürfte auf eine bessere Penetration des Uridins in die Zellen zurückzuführen sein, wobei möglicherweise die Virus-Neuraminidase eine Rolle spielt. Es ist bekannt, daß durch dieses Enzym die Oberfläche von Zellmembranen verändert wird (Saber et al., 1965). Bei der Aufnahme von P^{32} spielen diese Veränderungen offensichtlich keine Rolle. Damit ließe sich die erwähnte Diskrepanz am einfachsten erklären. Auch die Abnahme der Inkorporierung von C^{14} -Uridin in die RNS infizierter Zellen zu späteren Zeiten p.i. ist zu einem großen Teil auf eine Verminderung der Markierung des Pools mit dem Isotop zu erklären. Die zu diesen späteren Zeiten p.i. gefundene Verschlechterung der Stoffwechsellage der Wirtszellen (Abb. 1) kann demnach als erstes Zeichen eines auftretenden cytopathogenen Effektes angesehen werden.

Bei den meisten bisher veröffentlichten Untersuchungen über die Veränderung des RNS-Stoffwechsels virusinfizierter Zellen wurde eine parallele Bestimmung des säurelöslichen Pools

mit der des Einbaus in die RNS nicht durchgeführt, so daß alle diese Ergebnisse mit äußerster Vorsicht zu interpretieren sind. So ließen unsere Untersuchungen über den DNS-Stoffwechsel ohne Berücksichtigung der Markierung des säurelöslichen Pools ebenfalls eine Fehlinterpretation zu. Der Einbau des markierten DNS-Vorläufers H^3 -Thymidin in die DNS infizierter Zellen wird nämlich in den ersten Stunden p.i. gesteigert, um später rapide abzufallen (Abb. 4). Die entsprechende Kurve verläuft jedoch absolut parallel mit der Markierung des säurelöslichen Pools mit Hilfe von H^3 -Thymidin. Das bedeutet, daß der DNS-Stoffwechsel der Wirtszelle durch die Infektion in keiner Weise beeinflusst wird, wohl aber die Markierung des Vorläufer-Pools starken Veränderungen unterworfen ist. Diese Veränderungen dürften wiederum auf einer Änderung der Permeabilität der Zellwand und der allgemeinen Stoffwechsellage der Wirtszellen beruhen.

Autoradiographische Untersuchungen an ME-Virus-infizierten L-Zellen ergaben, daß die schon angelaufene DNS-Synthese der Zellen zwar nach der Infektion mit diesem kleinen RNS-haltigen Virus abgeschlossen wird, im Gegensatz zu den nichtinfizierten Zellen wird jedoch eine DNS-Synthese nicht mehr begonnen (Scholtissek et al., 1962). Ähnliche Aussagen können in dem hier untersuchten System nicht gemacht werden, da bei den Isotopen-Experimenten immer Minimal-Medium, d.h. ein Erhaltungsmedium verwendet wurde. In Gegenwart dieses Mediums findet keine Vermehrung der embryo-

nal en Hühnerzellen statt, so daß die DNS-Synthese auch in den nichtinfizierten Zellen innerhalb der nach Mediumwechsel folgenden 24 Stunden zum Erliegen kommt. Aus den hier beschriebenen Ergebnissen kann daher nur geschlossen werden, daß genau so wie bei der Infektion von L-Zellen mit ME-Virus im KP-Virus-System die bereits begonnene DNS-Synthese nicht abgeschaltet wird. Auf Grund der bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse läßt sich vermuten, daß der laufende DNS-Stoffwechsel von Zellen, die mit Einzelstrang-RNS-haltigen Viren infiziert waren, generell nicht abgeschaltet zu werden braucht. Auf der anderen Seite hat aber eine Hemmung der DNS-Synthese der Wirtszelle keinen Einfluß auf die KP-Virus-Vermehrung (Scholtissek und Rott, 1961 und persönliche Mitteilung).

Der Einbau von C^{14} -Leucin in KP-Virus-infizierten Zellen wird, wie schon Scholtissek und Rott (1965) zeigten, erst relativ spät nach der Infektion gehemmt (Abb. 5). Inwieweit bei der Markierung des Proteins die Penetration des Isotops in die Zelle bzw. auch ihre allgemeine Stoffwechsel-lage nach der Infektion eine Rolle spielt, - d.h. die Inkorporation nicht die Protein-Synthese repräsentiert - kann noch nicht entschieden werden. Die Bestimmung der Pool-Größen der Aminosäuren in den Zellen erfordert einen nicht zu rechtfertigenden Materialaufwand, so daß auf solche Untersuchungen in dieser Arbeit verzichtet werden mußte. Die zu späteren Zeiten nach der Infektion gefundene Inhibierung des C^{14} -Leucin-Einbaus in das Protein infi-

zierter Zellen, kann - wie die entsprechende bei der RNS - als ein erstes Zeichen des cytopathogenen Effektes gedeutet werden.

Mit Hilfe der Phenol-Extraktion und anschließender Gradienten-Zentrifugation der RNS infizierter embryonaler Hühnerzellen konnte keine dem Molekulargewicht der Virus-RNS entsprechende RNS-Fraktion nachgewiesen werden. Das Muster der RNS-Fraktion im Gradienten infizierter Zellen deckt sich praktisch mit den nichtinfizierter Zellen (siehe Abb. 2). Verwendet wurde bei diesen Untersuchungen eine Extraktionsmethode, die bei Zellen, die mit anderen RNS-haltigen Viren infiziert wurden, immer eine hochmolekulare Virus-RNS lieferte. Die Influenzaviren sind jedoch die einzigen bisher bekannten RNS-Viren, die sich im Zellkern vermehren. Es ist möglich, daß die hier angewendete Methode nicht in der Lage ist, aus den Zellkernen eine solche RNS zu extrahieren. Einige Versuche, bei denen härtere Methoden zur Extraktion angewendet wurden, führten immer zu einem teilweisen Abbau der Zell-RNS und waren deswegen nicht zu verwenden. Es ist aber auch daran zu denken, daß die KP-Virus-RNS in den infizierten Zellen überhaupt nicht in hochmolekularer Form vorliegt. Es war nämlich bisher auch nicht möglich, aus isolierten KP-Virus-Partikeln eine hochmolekulare RNS zu erfassen (Rott, persönliche Mitteilung).

Zusammenfassend zeigen unsere Befunde, daß durch die Infektion von embryonalen Hühnerzellen mit dem zur Influenzagruppe gehörenden KP-Virus, ein spezifischer Mechanismus zur Ausschaltung der Synthese bestimmter Makromoleküle nicht vorhanden ist. Erst zu späteren Zeiten nach der Infektion verschlechtert sich die allgemeine Stoffwechsellage, wobei vor allen Dingen an eine Beeinflussung des Energiestoffwechsels zu denken ist. Auf Grund von Ergebnissen ähnlicher Art wurde früher daran gedacht (Rott und Scholtissek, 1966), daß möglicherweise der Zelltod durch eine Überforderung der Synthese-Kapazität der Wirtszelle durch die Infektion bedingt wird, wobei die gesamte Stoffwechselregulation in Unordnung gerät. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, indem das KP-Virus chemisch und biologisch partiell inaktiviert wurde. Wie bereits erwähnt, können durch beide Verfahren die Kapazitäten zur Synthese der einzelnen Viruskomponenten entkoppelt werden.

Es wurde gefunden, daß bei einem solchen Inaktivierungsgrad, bei dem gerade noch die Synthese der Virus-Neuraminidase vonstatten gehen kann, aber nicht mehr infektiöse Viruspartikel oder Virus-Hämagglutinin gebildet werden, die Inhibierung der Markierung der einzelnen Makromoleküle auftritt. Wird dagegen die Kapazität zur Bildung der Neuraminidase zerstört, diejenige zur Bildung der Virus-RNS und des RNP-Antigens dagegen nicht beeinflußt, synthetisieren die so infizierten Zellen die entsprechenden Makromoleküle wie

nichtinfizierte Kontrollzellen (siehe Abb. 6 - 9). Nach diesen Befunden kann die oben genannte Hypothese als widerlegt gelten, da die normale Menge an bestimmten Viruskomponenten gebildet wird, ohne daß der Zellstoffwechsel darunter leidet. In Übereinstimmung damit stehen Untersuchungsergebnisse von Scholtissek (1966), die ergeben, daß neben dem Zellstoffwechsel unter diesen Bedingungen auch das morphologische Bild der Zellen nicht verändert wird.

Diese Befunde besagen, daß für die Ausbildung des cytopathogenen Effektes bei Influenzaviren eine Komponente verantwortlich ist, die unter der Direktion des genetischen Materials des Virus synthetisiert wird. Die Treffergröße für diese Komponente (Scholtissek und Rott, 1964) entspricht der der Neuraminidase. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß dieses Enzym den cytopathogenen Effekt auslöst. Die Spezifität der Neuraminidase liegt in der Abspaltung von Sialinsäure aus bestimmten Mucoproteiden, die in zellulären Membranen vorkommen. Es wäre daran zu denken, daß durch die Wirkung der Neuraminidase im Innern der Zellen lysosomale Membranen so verändert werden, daß sie für die in den Lysosomen lokalisierten zellauflösenden Enzyme durchlässig werden. Auch bei dem durch das Virus der Poliomyelitis hervorgerufenen cytopathogenen Effekt wird ein Angriff auf die Lysosomen der Wirtszelle angenommen, ohne daß hier Angaben über den Wirkungsmechanismus gemacht werden können (Wolff und Bubel, 1964).

Es wäre interessant zu prüfen, welche Rolle der cytopathogene Effekt für die Pathogenese der KP-Virusinfektion bei Hühnern spielt.

VI. Zusammenfassung

Untersuchungen über den DNS-, RNS- und Proteinstoffwechsel von Zellen, die mit dem Virus der Klassischen Geflügelpest (KP-Virus) infiziert waren, ergaben, daß die Markierung der Vorläufer der Nucleinsäuren mit radioaktiven Nucleosiden durch die Infektion stark beeinflußt wird. Die DNS-Synthese infizierter Zellen unterscheidet sich unter den eingehaltenen Bedingungen nicht von der nichtinfizierter Kontrollen. Die RNS-Synthese wird dagegen beim Maximum der Virus-RNS-Synthese (2 - 3 Stdn. p.i.) stark gesteigert, um zu späteren Zeiten nach der Infektion unter die Werte der Kontrollzellen abzufallen. Die Proteinsynthese wird erst relativ spät nach der Infektion gehemmt.

Anhaltspunkte über die Synthese hochmolekularer Virus-RNS nach der Infektion oder einer Doppelstrang-RNS wurden nicht erhalten.

Mit Hilfe der Methoden zur partiellen Inaktivierung des genetischen Materials des KP-Virus konnte gezeigt werden, daß entweder Virus-Neuraminidase oder zumindest eine virus-induzierte Substanz mit einer entsprechenden Treffergröße für den cytopathogenen Effekt verantwortlich ist.

VII. Literaturverzeichnis

1. Bablanian, R., H. J. Eggers und I. Tamm (1965)
Studies on the mechanism of poliovirus-induced cell damage.
Virology 26, 114 - 121.
2. Centanni und Savonuzzi (1900)
Zit. nach E. L. Stubbs in "Diseases of Poultry",
the Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA,
1952: S. 599 ff.
3. Committee on Standard Serological Procedures in In-
fluenza Studies (1950)
An agglutination-inhibition test proposed as a standard
of reference in influenza diagnostic studies.
J. Immunol. 65, 347 - 353.
4. Dulbecco, R. (1952)
Production of plaques in a monolayer tissue cultures
by single particles of an animal virus.
Proc. Nat. Acad. Sc. 38, 747 - 752.
5. Franklin, R. M. und D. Baltimore (1962)
Patterns of macromolecular synthesis in normal and
virus-infected mammalian cells.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 175 - 198.
6. Fritzsche, K. und Gerriets, E. (1962)
"Geflügelkrankheiten", Paul Parey, Berlin und
Hamburg. S. 134 - 136.
7. Giebler, P. (1958)
Definierung und Auswertung präparativer Ultrazen-
trifugierungen mit Hilfe des "Performance Index (Pi)".
Z. Naturforschg. 13b, 238 - 241.

8. Hirst, G. D. (1962)
Genetic recombination with Newcastle disease virus,
polioviruses, and influenza.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 27, 303 - 309.
9. Montagnier, L. und F. K. Sanders (1963)
Replicative form of encephalomyocarditis virus
ribonucleic acid.
Nature 199, 664 - 667.
10. Niggemeyer, W. F. (1956)
Absolute amount of ribonucleic acid in viruses.
Nature 178, 307 - 308.
11. Perroncito (1878)
Zit. nach E. L. Stubbs in "Diseases of Poultry",
the Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA,
1952: S. 599 ff.
12. Rott, R. (1965)
Untersuchungen über die Feinstruktur des infektiösen
Partikels der Newcastle Disease und über die neben
ihm auftretenden, nicht-infektiösen, virusspezifischen
Einheiten.
Zbl. Vet. Med. 12b, 74 - 116.
13. Rott, R. und W. Schäfer (1960)
Untersuchungen über die hämagglutinierenden nicht-
infektiösen Teilchen der Influenza-Viren.
I. Mitt.: Die Erzeugung von "Inkompletten Formen"
beim Virus der Klassischen Geflügelpest (von Magnus-
Phänomen).
Z. Naturforschg. 15b, 691 - 693.
14. Rott, R. und C. Scholtissek (1963)
Investigations about the formation of incomplete forms
of fowl plague virus.
J. gen. Microbiol. 33, 303 - 312.

15. Rott, R. und C. Scholtissek (1966)
Multiplication of myxoviruses.
Current Topics in Medical Virology (im Druck).
16. Saber, M. S., R. Drzeniek und M. Krüpe (1965)
Veränderung der Erythrozyten-Oberfläche durch Newcastle disease Virus.
I. Mitt.: Freilegung von ABH-Blutgruppen determinierenden Kohlenhydraten an Erythrozyten durch Neuraminidase-Einwirkung.
Z. Naturforschg. 20b, 965 - 973.
17. Schäfer, W. (1955).
Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und Klassischen Geflügelpest.
Z. Naturforschg. 10b, 81 - 91.
18. Scholtissek, C. (1957)
Über die PH-Abhängigkeit bei der Einwirkung zweier Äthyleniminochinone (Bayer E 39 und Bayer A 139) auf Nucleinsäuren.
Z. Krebsforschg. 62, 109 - 111.
19. Scholtissek, C. (1966)
Biochemical studies on the cytopathic effect of influenza viruses.
IX. Internationaler Kongreß für Mikrobiologie in Moskau.
20. Scholtissek, C. und R. Rott (1961)
Zusammenhänge zwischen der Synthese von Ribonucleinsäure und Protein bei der Vermehrung eines Virus der Influenza-Gruppe (Virus der Klassischen Geflügelpest).
Z. Naturforschg. 16b, 663 - 673.

21. Scholtissek, C. und R. Rott (1963)
Synthesis of viral ribonucleic acid by a chemically inactivated influenza virus.
Nature 199, 200 - 201.
22. Scholtissek, C. und R. Rott (1964)
Behaviour of virus-specific activities in tissue cultures infected with myxoviruses after chemical changes of the viral ribonucleic acid.
Virology 22, 169 - 176.
23. Scholtissek, C. und R. Rott (1965)
Metabolic changes in chick fibroblasts after infection with Newcastle disease virus.
Nature 206, 729 - 730.
24. Scholtissek, C., R. Rott und W. Schäfer (1962)
Verhalten von Viren gegenüber dem Bayer-Präparat A 139.
Z. Naturforschg. 17b, 222 - 227.
25. Scholtissek, C., R. Rott, P. Hausen, H. Hausen und W. Schäfer (1962)
Comparative Studies of RNA and protein synthesis with a myxovirus and a small polyhedral virus.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 27, 245 - 256.
26. Scholtissek, C., R. Drzeniek und R. Rott (1966)
Stepwise inactivation of influenza virus by serial undiluted passages.
Virology (im Druck).
27. Seto, J. T. und R. Rott (1966)
Functional significance of sialidase during influenza virus multiplication.
Virology (im Druck).

28. von Magnus, P. (1951)

Propagation of the PR8 strain of influenza A virus in chick embryo.

II. The formation of "incomplete" virus following inoculation of large doses of seed virus.

Acta path. et microbiol. Scand. 28, 278 - 293.

29. von Magnus, P. (1954)

Incomplete forms of influenza virus.

Advanc. Virus Res. 2, 59 - 79.

30. Wolff, D. V. und H. C. Babel (1964)

The disposition of lysosomal enzymes as related to specific viral cytopathic effects.

Virology 24, 502 - 505.

Es ist mir ein Bedürfnis, nach Abschluß
der Arbeit meinem hochverehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. R. Rott, für die The-
menstellung und die ständige Beratung
meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Weiterhin gilt mein aufrichtiger Dank
Herrn Privatdozent Dr. C. Scholtissek
für die mir stets gewährte Unterstützung,
die wertvollen Hinweise und seine Hilfs-
bereitschaft bei der Anfertigung der
Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 12. Februar 1940 wurde ich, Essam El- Din Mohamed Ayad, als vierter Sohn des Mohamed Ayad und dessen Ehefrau Fatma Zaki Shaker in Abou Tamada, Kafr El-Sheikh, V.A.R. (Ägypten) geboren.

Von 1947 - 1953 besuchte ich die Volksschule und ab 1953 die Staatliche El-Saidia Oberschule, an der ich im Jahr 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Von Oktober 1956 bis Januar 1962 studierte ich Veterinärmedizin an der Universität Kairo, und schloß das Studium mit dem Grad eines Bakkalaureus der Veterinärmedizin (B.V.Sc.) mit der Gesamtnote "gut" ab.

Von April 1962 bis März 1964 habe ich als Assistent an der Pharmakologischen Abteilung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Kairo gearbeitet.

Seit 1.4.1964 bin ich aufgrund eines Stipendiums der Assuit Universität, V.A.R., für einen Studienaufenthalt in Deutschland, um mich auf dem Gebiet der Virologie weiterzubilden.

Seit Juli 1964 bin ich Doktorand am Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität Gießen. Während dieser Zeit legte ich die Ergänzungsprüfung in Virologie, Mikrobiologie und Parasitologie mit der Gesamtnote "gut" ab. Außerdem fertigte ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr. R. Rott meine Dissertation über "Beeinflussung des Zellstoffwechsels nach der Infektion mit dem Virus der Klassischen Geflügelpest" an.

